

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central figure of a man on horseback, surrounded by various symbols including a crown, a lion, and architectural elements. The Latin text 'UNIVERSITAS SAN CAROLINIENSIS' is visible around the perimeter of the seal.

**MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA *Phlebodium psedo aureum* (Cav.)  
Lellinger CON TRES TIPOS DE EXPLANTES  
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO *in vitro***

**JOSÉ MAURICIO ROSALES CASTILLO**

**Guatemala, noviembre de 2005**

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

TESIS  
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA  
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

**JOSÉ MAURICIO ROSALES CASTILLO**

En el acto de investidura como

**INGENIERO AGRÓNOMO**

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA  
EN EL GRADO ACADÉMICO DE LICENCIADO**

Guatemala, noviembre de 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

**Dr. M.V. Luis Alfonso Leal Monterroso**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA**

|                      |                  |  |
|----------------------|------------------|--|
| <b>DECANO</b>        | <b>Ing. Agr.</b> | <b>Ariel Abderramán Ortiz López</b>    |
| <b>VOCAL PRIMERO</b> | <b>Ing. Agr.</b> | <b>Alfredo Itzep Manuel</b>            |
| <b>VOCAL SEGUNDO</b> | <b>Ing. Agr.</b> | <b>Walter Arnoldo Reyes Sanabria</b>   |
| <b>VOCAL TERCERO</b> | <b>Ing. Agr.</b> | <b>Erberto Raúl Alfaro Ortíz</b>       |
| <b>VOCAL CUARTO</b>  | <b>M.E.P.U.</b>  | <b>Elmer Antonio Álvarez Castillo</b>  |
| <b>VOCAL QUINTO</b>  | <b>P.M.P.</b>    | <b>Miriam Eugenia Espinoza Padilla</b> |
| <b>SECRETARIO</b>    | <b>Ing. Agr.</b> | <b>Pedro Peláez Reyes</b>              |

Guatemala, noviembre de 2005

**Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente**

**Distinguidos miembros:**

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el documento de graduación titulado:

**MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA *Phlebodium psedoaurum* (Cav.)  
Lellinger CON TRES TIPOS DE EXPLANTES  
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO *in vitro***

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Respetuosamente,

JOSÉ MAURICIO ROSALES CASTILLO

## ACTO QUE DEDICO

**A:**

**PAPA=DIOS:**

“Que su amor es lo único que necesito pues su poder se muestra mejor en los débiles”. Así que me alegro de ser débil para que en mí se muestre el poder de Cristo (2ª Corintios 12:9).

**MIS PADRES:**

**José Luis Rosales Padilla y Luz Castillo Milla de Rosales** porque en ellos he podido ver el amor de Dios en mi vida y he podido confirmar San Juan 4:12. Los amo y quiero infinitamente.

**MIS HERMANOS:**

**Lorena, Luis Miguel, Verónica y Monica**, por amarme y apoyarme incondicionalmente, los amo a cada uno tal y como son “Gracias”.

**MIS SOBRINOS:**

**Rodrigo Alejandro y Luis Pedro Figueroa**, por su amor y cariño deseándoles éxitos en sus estudios.

**MIS TIOS:**

**Stella Castillo Milla de Pinot, Félix Castillo Milla, Fe y O Castillo Milla**, por su amor y cariño y a todos mis tíos y primos en general.

**MI CUÑADO:**

**Guillermo Iriarte Letona**, por las veces que hemos compartido y platicado.

**MI NOVIA Y SUS PADRES:**

Por sus oraciones y apoyo espiritual en los seminarios de tesis que se evaluaron. Gracias **Blanqui**, por tener fe en Dios y en mí.

**MIS AMIGOS Y  
COMPAÑEROS:**

**Jorge Morales** y familia, **Jack** y **Rae Leeth**, **José Luis Castañeda** y familia, **Juan Carlos Casados** y familia, **Efraín Sosa Leonardo** y familia, **César Córdón y familia**, **Carlos Bonilla**, **Carlos Molina**, **Luis Humberto Martínez** y familia, **José Tojin Silva**, **Patty Ramos Recinos** y a todas las personas que han sido bendición en mi vida de una u otra forma.

**MIS AMIGOS Y  
HERMANOS EN CRISTO:**

**Raúl Gabriel Vargas** y familia, **Comunidad San Pablo**, **Exgrupo Shalom**, y especial agradecimiento a **Casa Josué**, por su amor y apoyo espiritual.

**Y A USTED:**

Por festejar conmigo el día de hoy.

## **TESIS QUE DEDICO**

**A:**

Mi país Guatemala.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Facultad de Agronomía.

Laboratorio de cultivo de tejidos de la Sub-área de manejo y mejoramiento de plantas.

Instituto de Investigaciones Agronómicas.

Centro de Documentación e Información.

Al magisterio guatemalteco y a los docentes y auxiliares de la Facultad de Agronomía.

## AGRADECIMIENTOS

**A:**

Mis asesores **Ing. Agr. José Vicente Martínez Arévalo, Ing. Agr. Msc. Domingo Amador Pérez.**

**Ing. Agr. Mack Milan Cruz Sic**, por el apoyo brindada durante la fase de laboratorio.

**Ing. Agr. Jorge Luis Ovalle Aguirre**, por haberme proporcionado espacios en horas laborales para concluir mi trabajo de graduación.

Los coordinadores de seminario de tesis **Ingenieros David Monterroso, Edin Orozco, Francisco Vásquez**, evaluadores de seminario **Ingenieros Hermógenes Castillo, Juan Herrera** y mi asesor de EPSA **Marco Nájera Caal (+)**.

## CONTENIDO GENERAL

|        |  |     |
|--------|--|-----|
|        | ÍNDICE DE FIGURAS  | iv  |
|        | ÍNDICE DE CUADROS  | vi  |
|        | RESUMEN  | vii |
| 1.     | INTRODUCCIÓN   | 1   |
| 2.     | DEFINICIÓN DEL PROBLEMA  | 2   |
| 3.     | MARCO TEÓRICO  | 3   |
| 3.1    | MARCO CONCEPTUAL   | 3   |
| 3.1.1  | GENERALIDADES DE LOS HELECHOS  | 3   |
| 3.1.2  | LAS PLANTAS MEDICINALES  | 3   |
|        | A. Plantas medicinales bajo cultivo  | 4   |
|        | B. Generalidades de los principios activos de las plantas medicinales                          | 5   |
| 3.1.3  | ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN  | 5   |
|        | A. Asepsia del cultivo   | 6   |
|        | B. Multiplicación  | 6   |
|        | C. El enraizamiento y la preparación del inóculo (aclimatación)<br>para su trasplante al suelo | 6   |
| 3.1.4  | COMPOSICIÓN GENERAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO   | 6   |
| 3.1.5  | SALES INORGÁNICAS  | 7   |
|        | A. Macronutrientes   | 7   |
|        | B. Micronutrientes   | 7   |
| 3.1.6  | VITAMINAS  | 7   |
|        | A. Tiamina   | 8   |
|        | B. Piridoxina  | 8   |
|        | C. Ácido pantoténico   | 8   |
|        | D. Ácido fólico  | 8   |
|        | E. Riboflavina   | 8   |
|        | F. Vitamina E  | 8   |
|        | G. Mio-inositol  | 8   |
| 3.1.7  | REGULADORES DE CRECIMIENTO   | 8   |
|        | A. Auxinas   | 8   |
|        | B. Citocininas   | 11  |
|        | C. Giberelinas   | 12  |
|        | D. Ácido abscísico   | 13  |
| 3.1.8  | AMINOÁCIDOS  | 14  |
| 3.1.9  | CARBOHIDRATOS  | 14  |
| 3.1.10 | AGUA   | 14  |
| 3.1.11 | AGENTES SOLIDIFICANTES   | 14  |
| 3.1.12 | SUPLEMENTOS NO DEFINIDOS   | 15  |
| 3.2    | MARCO REFERENCIAL  | 16  |
| 3.2.1  | LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO   | 16  |
| 3.2.2  | EL CICLO VITAL DE UN HELECHO   | 16  |
|        | A. Reproducción natural de la calahuala  | 17  |
| 3.2.3  | MICROPROPAGACIÓN DE LOS HELECHOS   | 18  |
|        | A. Cultivo de esporas <i>in vitro</i>  | 18  |
|        | B. Cultivo de brotes   | 19  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.2.4 | CARACTERÍSTICAS DE LA CALAHUALA <i>Phlebodium pseudoaureum</i><br>(Cav.) Lellinger                | 20 |
| A.    | Clasificación taxonómica  | 20 |
| B.    | Descripción botánica de la calahuala  | 20 |
| C.    | Distribución geográfica de la calahuala   | 20 |
| D.    | Usos medicinales atribuidos a la calahuala  | 21 |
| 3.2.5 | CONDICIONES CLIMÁTICAS PARA LA PROPAGACIÓN<br>DE LA CALAHUALA                                     | 21 |
| 4.    | OBJETIVOS   | 22 |
| 4.1   | OBJETIVO GENERAL  | 22 |
| 4.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 22 |
| 5.    | HIPÓTESIS   | 23 |
| 6.    | METODOLOGÍA   | 24 |
| 6.1   | ÁREA EXPERIMENTAL   | 24 |
| 6.2   | INSTRUMENTOS, EQUIPO, CRISTALERÍA Y REACTIVOS   | 24 |
| 6.2.1 | INSTRUMENTOS  | 24 |
| 6.2.2 | EQUIPO  | 24 |
| 6.2.3 | CRISTALERÍA   | 24 |
| 6.2.4 | REACTIVOS   | 24 |
| 6.3   | FASES DE LA INVESTIGACIÓN   | 25 |
| 6.4   | FASE DE CAMPO: RECOLECCIÓN EN CAMPO E INCREMENTO DE<br>PLANTAS DONANTES DE EXPLANTES DE CALAHUALA | 25 |
| 6.4.1 | RECOLECCIÓN DE CALAHUALA EN EL CAMPO  | 25 |
| 6.4.2 | SIEMBRA DE PLANTAS DONANTES DE EXPLANTES  | 25 |
| 6.4.3 | MANEJO AGRONÓMICO DE LAS PLANTAS DONANTES DE<br>EXPLANTES   | 26 |
| A.    | Riego   | 26 |
| B.    | Fertilización   | 27 |
| C.    | Control fitosanitario   | 27 |
| D.    | Control de malezas  | 27 |
| 6.5   | FASE DE LABORATORIO: PROPAGACIÓN DE PLANTAS DE CALAHUALA  | 27 |
| 6.5.1 | PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ESPORAS   | 27 |
| A.    | Tratamientos  | 27 |
| B.    | Unidad experimental   | 28 |
| C.    | Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales                                 | 29 |
| D.    | Variables de respuesta  | 30 |
| E.    | Manejo del experimento  | 30 |
| F.    | Toma y registro de datos  | 33 |
| G.    | Análisis de la información  | 33 |
| 6.5.2 | PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ÁPICES DE BROTE   | 34 |
| A.    | Tratamientos  | 34 |
| B.    | Unidad experimental   | 35 |
| C.    | Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales                                 | 35 |
| D.    | Variables de respuesta  | 36 |
| E.    | Manejo del experimento  | 36 |
| F.    | Registro de datos y análisis de la información  | 38 |
| 6.5.3 | PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE PRIMORDIOS<br>FOLIARES                                      | 38 |
| A.    | Tratamientos  | 38 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| B.    | Unidad experimental   | 39 |
| C.    | Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales           | 40 |
| D.    | Variables de respuesta  | 41 |
| E.    | Manejo del experimento  | 41 |
| F.    | Toma y registro de datos  | 43 |
| 7.    | RESULTADOS Y DISCUSIÓN  | 43 |
| 7.1   | PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ESPORAS                               | 43 |
| 7.1.1 | NÚMERO DE ESPOROFITOS POR UNIDAD EXPERIMENTAL                               | 44 |
| 7.1.2 | ALTURA PROMEDIO DE ESPOROFITOS  | 48 |
| 7.1.3 | REPRODUCCIÓN NATURAL VERSUS REPRODUCCIÓN <i>IN VITRO</i>                    | 51 |
| 7.2   | PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ÁPICES DE BROTE Y PRIMORDIOS FOLIARES | 53 |
| 8.    | CONCLUSIONES  | 54 |
| 9.    | RECOMENDACIONES   | 55 |
| 10.   | BIBLIOGRAFÍA  | 56 |
| 11.   | ANEXOS  | 58 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1.  | Algunos componentes de un medio de cultivo en general  | 7  |
| Figura 2.  | Ciclo general de los helechos  | 17 |
| Figura 3.  | Cama de incremento de <i>Phlebodium psedoareum</i> (Cav.) Lellinger que se ubicó dentro del umbráculo  | 26 |
| Figura 4.  | Unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de esporas  | 28 |
| Figura 5.  | Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala por medio de esporas  | 29 |
| Figura 6.  | Obtención y desinfección de soros de plantas donantes  | 31 |
| Figura 7.  | Secuencia desde la inoculación de soros hasta la obtención de esporofitos jóvenes de calahuala   | 33 |
| Figura 8.  | Unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote  | 35 |
| Figura 9.  | Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote                                      | 36 |
| Figura 10. | Disección de explantes de ápice de brote de calahuala en la cámara de flujo laminar  | 37 |
| Figura 11. | Unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares  | 39 |
| Figura 12. | Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares                                  | 40 |
| Figura 13. | Esporas de <i>Phlebodium psedoareum</i> (Cav.) Lellinger germinadas entre los 16 a 25 días después de la siembra                               | 43 |
| Figura 14. | Masa de protalos a los 90 días después de la siembra de las esporas y previo al licuado de los mismos  | 44 |
| Figura 15. | Resumen de la prueba de medias de Tukey para el número de esporofitos por unidad experimental  | 45 |
| Figura 16. | Resumen del análisis de regresión: concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog sobre el número de esporofitos por unidad experimental | 47 |
| Figura 17. | Resumen de la prueba de medias de Tukey para la altura en centímetros de los esporofitos   | 49 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 18. | Resumen del análisis de regresión: número de esporofitos jóvenes de calahuala por unidad experimental versus altura de esporofitos en centímetros | 50 |
| Figura 19. | Esporofitos jóvenes propagados naturalmente a partir de esporas en aldea La Ciénaga, San José Pinula, Guatemala.                                  | 51 |
| Figura 20. | Esporofitos jóvenes de calahuala obtenidos a partir de esporas en el medio de cultivo Murashige y Skoog   | 52 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Cuadro 1. | Dosis en mg/L de cada componente del medio MS para cada uno de los 4 tratamientos  | 28 |
| Cuadro 2. | Formato para registrar el número de esporofitos jóvenes y altura promedio (cm) por unidad experimental   | 33 |
| Cuadro 3. | Tratamientos para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote   | 34 |
| Cuadro 4. | Dosis de cada componente del medio de cultivo Murashige (1974)   | 34 |
| Cuadro 5. | Tratamientos para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote   | 38 |
| Cuadro 6. | Dosis de cada componente del medio de cultivo Wetmore 1954   | 39 |
| Cuadro 7. | Resumen de la prueba de medias de Tukey para el número de esporofitos por unidad experimental  | 45 |
| Cuadro 8. | Incremento o pendiente del modelo cuadrático de regresión: concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) versus el número de esporofitos | 48 |
| Cuadro 9. | Resumen del ANDEVA para la altura promedio de esporofitos  | 48 |

**MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA *Phlebodium psedoareum* (Cav.) Lellinger  
CON TRES TIPOS DE EXPLANTES  
EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO *IN VITRO***

**CALAHUALA *Phlebodium psedoareum* (Cav.) Lellinger MICROPROGATION WITH THREE  
EXPLANT TYPES IN DIFFERENT *IN VITRO* CULTURE MEDIUM**

**RESUMEN**

El objetivo principal de la presente investigación fue establecer una forma de propagación alternativa de la calahuala *Phlebodium psedoareum* (Cav.) Lellinger, que permita obtener gran cantidad de esporofitos jóvenes, a fin de aumentar la tasa de propagación de ésta que actualmente por medio de rizomas a campo abierto oscila alrededor del 35 %, con lo cual se extrae gran cantidad de material para dicho propósito, razón por la cual se encuentra en la lista roja de especies en peligro de extinción del CONAP.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala y se evaluó la respuesta de la calahuala *Ph. psedoareum* a la micropropagación por medio de tres tipos de explante (soros, ápices de brote y primordios foliares). Como resultado se tiene que es difícil propagar la calahuala por medio de ápices de brote en el medio Murashige (1974), así como por primordios foliares en el medio Wetmore, pero si se puede micropropagar satisfactoriamente por medio de esporas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), obteniendo el mayor número de esporofitos jóvenes por unidad experimental (234.7 esporofitos) con una altura de 1.341 centímetros cuando se emplea éste medio al 50 por ciento de su composición original

## 1. INTRODUCCIÓN

La Calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger es un helecho epífita con rizoma rastrero y sinuoso, nativo de Centro América. En forma silvestre crece en troncos de palmas, broza o árboles de encino y roca caliza desintegrada, y en lugares de gran humedad a la sombra.

Se encuentra desde México hasta América del Sur, en alturas de 1,200-2,200 msnm. En Guatemala se reporta en Alta y Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (5), aunque también se le ha encontrado en Guatemala, El Quiché, San Marcos y El Progreso. El rizoma es conocido en dichas regiones por sus propiedades medicinales tales como: tratamiento de afecciones intestinales (*diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis*), respiratorias (*asma, tos, tos ferina*) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificación de la sangre, parásitos, enfermedades venéreas como la sífilis y algunas afecciones renales (*cálculos, hidropesía*) (5).

Por sus propiedades medicinales los colectores han ejercido presión sobre el bosque al extraerla para su comercialización intensiva, lo cual provoca sobreexplotación de la misma y de tal manera su extinción, por lo que *Ph pseudoaureum* se encuentra en el listado de Especies de Flora Silvestre Amenazadas de Extinción (Lista Roja de Flora) Resolución No. ALC 028/2001 del Consejo Nacional de Áreas protegidas (7).

A través de la presente investigación se identificó un medio de cultivo de tejidos *in vitro* apropiado para micropropagar la calahuala.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En Guatemala, la calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger es una especie que normalmente se le encuentra en estado silvestre desarrollándose en áreas húmedas sobre troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada. Debido a la importancia económico social que reviste por sus propiedades medicinales y al auge que ha tomado en los últimos años el consumo de los rizomas de ésta, recientemente se ha iniciado el proceso de domesticación de la misma.

Andrade Castañeda, en mayo de 2003 (3), contribuye con el primer trabajo titulado “Búsqueda de sustratos opcionales para la producción bajo cultivo de calahuala *Ph. pseudoaureum*”; en esta investigación se identifica las astillas provenientes de desechos de madera de los aserraderos como una buena base de sustrato para propagar la calahuala por medio de rizomas bajo condiciones de cultivo.

Actualmente en Guatemala, la calahuala solo la propagan en condiciones de cultivo a nivel experimental por medio de rizomas, lo que implica varias desventajas tales como: extraer grandes cantidades de rizomas de los reservorios naturales donde corre peligro de extinción. El material obtenido es variable en sus características botánicas y se tiene solamente el 35 % de pegue en la propagación por este medio (3).

En tal sentido dentro del proceso de la domesticación de la calahuala, en el aspecto primario que se refiere a la propagación, no se cuenta con información científica acerca de la respuesta de la calahuala a la propagación por medio de métodos especializados como los biotecnológicos, en particular la micropropagación *in vitro* en forma sexual y asexual a través de explantes, que podrían representar una muy buena alternativa a la forma actual de propagación.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 MARCO CONCEPTUAL**

##### **3.1.1 GENERALIDADES DE LOS HELECHOS**

Hay alrededor de unas 10,000 especies modernas de helechos de los cuales la mayoría pertenece al orden Filicales llamado también (Polypodiales). Se encuentran en una amplia variedad de ecosistemas, pero la mayoría de ellos se localiza en partes sombreadas, en sitios bien húmedos y en climas tropicales o subtropicales (8).

Los helechos se pueden reproducir en forma en forma sexual o asexual por esporas o rizomas, sobre el envés de las hojas se forman estructuras llamadas soros, compuestas por grupos de esporas resguardados dentro esporangios y que forman el principal mecanismo de reproducción de estas especies en forma natural (18).

En función de su forma de nutrición los helechos son epifitos o sea que crecen adheridos a otra planta o sustrato sin tomar alimento de su hospedero, solo humedad. También se puede ver en la forma de alimentación de los helechos que el protalo (estructura diminuta en comparación con el esporofito maduro), constituye una planta autotrófica independiente que inclusive sostiene al embrión del esporofito durante los primeros estadios del desarrollo (18).

##### **3.1.2 LAS PLANTAS MEDICINALES**

El hombre se ha beneficiado de las plantas medicinales desde la prehistoria y, hasta hace relativamente poco tiempo, eran el único recurso del que disponían los médicos. A principios del siglo XX la medicina dio un gran salto gracias al desarrollo de la química y al descubrimiento de complicados procesos de síntesis orgánica que dieron lugar a nuevos medicamentos capaces de luchar contra enfermedades hasta entonces incurables, principalmente infecciones. Sin embargo, siguieron obteniéndose de las plantas medicinales valiosas sustancias que eran irremplazables; la medicina popular y los herbolarios, por su parte, mantenían viva esta tradición terapéutica que ha evolucionado aumentando el número de plantas medicinales conocidas y también sus aplicaciones (6).

Se ha comprobado un renacimiento del interés por las plantas medicinales, tanto por parte de investigadores, médicos y de la industria farmacéutica, como del público en general, deseoso de ampliar sus conocimientos acerca de este campo (6).

Los remedios a base de plantas reúnen ventajas frente a los químicos, ya que sus principios activos están biológicamente equilibrados y en general, no se acumulan en el organismo ni tienen efectos indeseables, exceptuando las sustancias de las plantas venenosas. Pero no hay que olvidar que las sustancias naturales no son siempre apropiadas para todas las situaciones; es al médico a quien corresponde determinar el tratamiento de la enfermedad (6).

#### **A. Plantas medicinales bajo cultivo**

Durante algún tiempo se pensó que la planta cultivada pierde parte de sus principios activos y virtudes terapéuticas, lo cual es totalmente falso. Si seleccionamos el ecotipo o clon, y se implanta éste en el hábitat adecuado y se realizan los tratamientos culturales precisos, el rendimiento en principios activos y su calidad, es superior a la planta silvestre (1).

Las principales ventajas del cultivo son: evitar las mezclas y falsificaciones del material recolectado; se puede obtener una materia prima homogénea, abundante y de buena calidad; la recolección se facilita y en muchos casos puede mecanizarse; los agricultores pueden asociarse para montar viveros, adquirir herramienta especial y montar pequeñas industrias agrarias de primera transformación, secaderos y destilerías, en las inmediaciones, con lo que se reducen los gastos del cultivo y transporte. Estos cultivos y pequeñas industrias fijan mano de obra rural y especializada: pero sobre todo es la única forma de seleccionar y mejorar el material vegetal implantado y cultivado (1).

La actual coyuntura socioeconómica y el acelerado aumento demográfico, obliga a los países a buscar nuevas fuentes de materias primas, para cubrir la demanda de las industrias farmacéuticas, alimentaria y perfumera, así como a investigar nuevos principios activos, sabores y aromas en el reino vegetal, base para la elaboración de nuevos fármacos, que exigen las necesidades medicas actuales, o para satisfacer las necesidades creadas por una sociedad de consumo, cada vez más refinada (1).

Para lograr estos objetivos, de carácter multidisciplinario, son precisos estudios coordinados con los diversos campos de la Botánica, Agronomía, Ingeniería Industrial, Fotoquímica, Farmacología, Dietética, etc., que acometen especialistas de los distintos países, partiendo de sus posibilidades y experiencia en los distintos campos (1).

## **B. Generalidades de los principios activos de las plantas medicinales**

Los principios activos de las plantas medicinales se trata de sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento con ayuda del metabolismo. Sin embargo, no todos estos productos metabólicos tienen un valor medicinal directamente aprovechable. En todas las especies están presentes al mismo tiempo principios activos y sustancias indiferentes. Estas últimas, llamadas también de lastre, determinan la eficacia del medicamento vegetal en cuestión al acelerar o hacer más lenta la absorción de los primeros en el organismo. Esta es la primera de las peculiaridades de los medicamentos de origen vegetal (1).

Casi siempre en una misma planta existen varios componentes medicinalmente activos, de los cuales uno de ellos – el principal– determina las aplicaciones que tendrá la especie en cuestión. Sin embargo, el grado en el que los componentes secundarios influyen sobre la acción queda puesto de manifiesto al aislar el principio activo principal. Es muy frecuente que su efecto sea entonces totalmente distinto. Solamente el concierto de todos los componentes, incluyéndose aquellos de lastre, confiere a la planta sus acción específica, y esta es la segunda peculiaridad (1).

Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta. Se concentran preferentemente en las flores, las hojas o las raíces, y a veces en las semillas, en los frutos o en la corteza (1).

La tercera peculiaridad es la siguiente: el contenido en principios activos de una planta medicinal oscila, dependiendo del hábitat de la misma, de la recolección y de la preparación. Esto constituye una desventaja pero puede evitarse en medida recolectando en la época más adecuada y preparándola con el máximo cuidado.

Los ejemplares bien tratados, almacenados de modo correcto, apenas pierden principios activos en el proceso de secado. La mayoría de las plantas medicinales desarrollan plenamente su eficacia solo cuando se las emplea por periodos prolongados de tiempo (como por ejemplo una cura de 6 a 8 semanas) (1).

### **3.1.3 ETAPAS DE LA MICRO PROPAGACIÓN**

Las etapas que conlleva la micropropagación según Murashige, 1974 (23) están definidas de la manera siguiente: establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación, enraizamiento y preparación del inóculo (aclimatación) para su trasplante al suelo.

### **A. Asepsia del medio de cultivo**

Los medios de cultivo son propicios para el desarrollo de microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente o llegan con el explante y reducen la calidad de las plantas producidas, además de competir por el espacio y alimento del cultivo, por lo cual es necesario que el explante se encuentre debidamente limpio y desinfectado. Los compuestos químicos más utilizados para la limpieza y desinfección de explantes son el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloruro de mercurio, el cloro comercial y el alcohol en diferentes concentraciones (15).

### **B. Multiplicación**

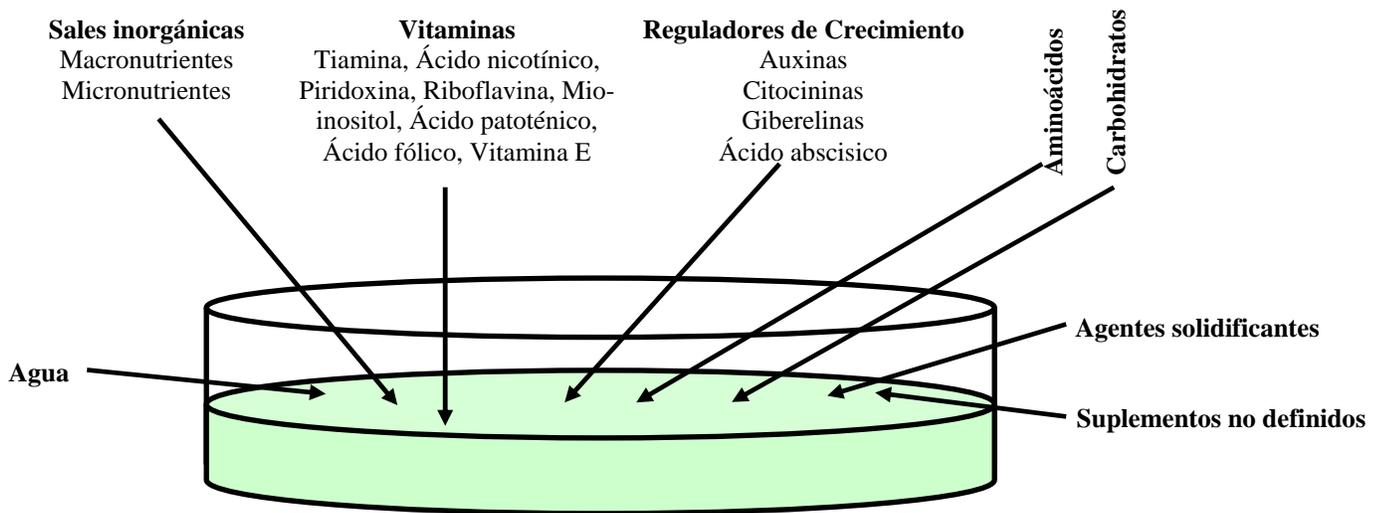
Esta fase se ve influenciada por las condiciones nutritivas y micro climáticas *in vitro*, y la ganancia en peso seco da como resultado la diferenciación *de novo*. La formación de nuevas células por división, producen esa ganancia en peso (22).

### **C. El enraizamiento y la preparación del inóculo (aclimatación) para su transplante al suelo**

Esta fase consta de dos pasos: el primero, se inicia con trasladar el material vegetal a otro medio de cultivo con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir; disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. El segundo paso, consiste en lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que quedan en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas, a las cuales se les van abriendo agujeros para que las plantas se adapten paulatinamente a su nuevo hábitat. Esta última parte de esta fase se le conoce como aclimatación o endurecimiento de la planta (22).

## **3.1.4 COMPOSICIÓN GENERAL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

En general los medios de cultivo se encuentran constituidos por los siguientes componentes que se ilustran en la Figura 1.



**Figura 1. Algunos componentes de un medio de cultivo en general**

Una descripción más detallada de cada uno de los componentes que pueden conformar un medio de cultivo se presenta en los incisos siguientes:

### 3.1.5 SALES INORGÁNICAS

Las sales inorgánicas se pueden dividir en dos grandes grupos, macronutrientes y micronutrientes tal como se indica a continuación:

#### A. Macronutrientes

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además carbono, hidrogeno y oxigeno, los elementos mas requeridos son principalmente: N, P, K, Ca, Mg, y S (28).

#### B. Micronutrientes

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co, y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (28).

### 3.1.6 VITAMINAS

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades. Las vitaminas más empleadas son:

- A. Tiamina**  
Conocida también como vitamina B1. Se añade como tiamina-HCL en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de las células vegetales (28).
- B. Piridoxina**  
Conocida también como vitamina B6. Se añade como piroxina –HCL.
- C. Ácido pantoténico**  
Ayuda al crecimiento de ciertos tejidos.
- D. Ácido fólico**  
Disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-amino benzoico.
- E. Riboflavina**  
Es inhibidor del crecimiento de raíces.
- F. Vitamina E**  
Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células.
- G. Mio-inositol**  
No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico (28).

### 3.1.7 REGULADORES DE CRECIMIENTO

En cultivo de tejidos se utilizan propiamente cuatro grupos: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico.

- A. Auxinas**  
Las auxinas contribuyen a la elongación celular. Tienen como función biológica la expansión de las células del tallo y coleótilos, a través de promover el ensanchamiento de las paredes celulares en la división celular; así mismo, fomentan el desarrollo de callos, e inducen la formación de raíces a partir de este. Se utilizan también para el enraizamiento de varias especies vegetales (30).

La auxina se sintetiza principalmente en los ápices de tallos y raíces, de donde migra a la zona de elongación y otras zonas donde ejercerá su acción (2).

**a. Uso de las auxinas en cultivo de tejidos vegetales**

Las auxinas son ampliamente utilizadas en trabajos de micropropagación y son incorporadas al medio nutritivo para promover el crecimiento de callo, suspensiones celulares u órganos y para regular la morfogénesis, conjuntamente con las citocininas. La selección de auxinas a utilizar y la concentración requerida dependerá de:

- i. El tipo de crecimiento o desarrollo requerido.
- ii. Los niveles naturales de auxina dentro del explante cuando es disectado.
- iii. La capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar auxina en forma natural.
- iv. La interacción (si hay) entre las auxinas sintéticas aplicada y las hormonas endógenas naturales (2).

**b. Modo de acción de las auxinas y respuesta fisiológica en la planta**

Las auxinas actúan promoviendo el crecimiento y en morfogénesis como sigue:

**i. Promoviendo el crecimiento**

Induciendo la secreción de iones  $H^+$  en y a través de la pared celular. El enlace de la auxina conduce al rompimiento y acidificación de la pared, incrementando su tamaño. Por un efecto sobre el metabolismo del ARN (y por tanto la síntesis de proteína), posiblemente por inducción de la transcripción de moléculas de ARN mensajero específico (ARNm). Los ARNm codifican proteínas que son requeridas para mantener (sostener) el crecimiento (2).

**ii. Morfogénesis**

Las auxinas aplicadas son capaces de borrar la fisiología programada genéticamente de tejidos de plantas completas, que fuera previamente determinada en su estado diferenciado (2).

Las respuestas fisiológicas que las auxinas provocan en las plantas se pueden resumir en forma general como sigue:

- ii.1** Afectan una expansión celular como ya fue explicado, a través del aumento de la plasticidad de la pared celular. Este efecto de estimular la expansión celular se traduce en un estímulo al crecimiento, en escala macroscópica.

- ii.2 La síntesis de ARN es el estímulo de la división celular que ocurre en algunas situaciones después de la aplicación de auxina exógena, contribuye al estímulo del crecimiento.
- ii.3 La formación de raíces en esquejes de distintos tipos.
- ii.4 Dominancia apical; una auxina producida en el meristemo apical impone un estado de dominancia en las yemas axilares localizadas abajo del meristemo apical, inhibiendo su crecimiento. Si el meristemo apical es removido, las yemas axilares son liberadas de la dominancia y comienzan a crecer.
- ii.5 Otros efectos más específicos son la inducción floración (2).

**c. Auxinas reguladoras del crecimiento comúnmente utilizadas**

Las auxinas más comúnmente utilizadas son el 2,4-D; Ácido 3-indolbutírico (IBA); Ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA). Junto con las citocininas, el 2,4-D es utilizado para la inducción de callo y cultivos en suspensión, siendo reemplazado por ANA e IBA cuando es requerida la morfogénesis. ANA e IBA son auxinas favoritas para el cultivo de tejidos vegetales. Otras auxinas utilizadas con menos frecuencia son:

- i. 4- CPA: ácido 4-clorofenoxiacético
- ii. MCPA: ácido 2- metil -4-clorofenoxiacético
- iii. 2,4,5,-T: ácido 2,2,5-triclorofenoxiacético
- iv. Dicamba: ácido 3,6-dicloroanísico
- v. Picloram: ácido 4 -amino,3,5,6-tricloropicolínico (2).

**d. Efectos de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales**

- i. Inducción de la formación de callo
- ii. Inhibición de formación de clorofila
- iii. Morfogénesis: formación de raíz y brote
- iv. Embriogénesis somática: altos niveles de auxina 2,4-D
- v. Cultivo de órganos; una auxina es casi invariablemente requerida para promover el crecimiento inicial de explantes de meristemo y puntas de brotes (2).

**e. Estabilidad de las auxinas en los medios de cultivo**

IAA e IBA son termolábiles y son descompuestos durante la esterilización en autoclave, pero el IAA no es estable en el medio de cultivo aun si es esterilizado por ultrafiltración (2).

#### f. **Ruta de biosíntesis del ácido indolacético**

El IAA es formado del aminoácido L-triptofano y los niveles endógenos de las auxina se incrementa rápidamente en tejidos incubado en un medio de cultivo conteniendo este aminoácido. L-tripófano puede también actuar como una auxina en algunas plantas, en estos casos puede estimular el crecimiento o inducir morfogénesis (crecimiento de callo de híbridos de *Nicotiana glauca* X *N. Langsdorfii* y la formación de callos embriogénicos en algunos cultivares de arroz) (2).

#### B. **Citocininas**

Promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son: benciladenina (BA), cinetina y zeatina, en concentración de 0.03 – 30 mg/l. La BA es la citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y de yemas adventicias (28).

La función biológica de las citocininas es estimular principalmente la división celular o citocinesis. Perea, citado por Villacinda (29), menciona que en cultivos *in vitro*, las citocininas han permitido grandes progresos, especialmente, en micropropagación, por su función de proliferación celular mediante la división celular y la diferenciación de los explantes. Las citocininas mas utilizadas son la bencilaminopurina (BAP), siendo ésta más utilizada que la cinetina (KIN) y la 6-4-hidroxi-e-meil but-tran-2-erilamino-purina (ZEA).

#### a. **Biosíntesis, lugar de síntesis y transporte de las citocininas**

Las citocininas parecen ser sintetizadas por la incorporación de una cadena lateral, generalmente con cinco carbonos en la posición N<sub>6</sub> de la base nitrogenada adenina. Esta base nitrogenada tiene la estructura idéntica a la adenina que ocurre en los ácidos nucleicos. Los diferentes tipos de citocininas difieren entre sí por la modificación de las cadena laterales (2).

Las citocininas naturales son encontradas en todas las plantas superiores, en las algas y en los hongos y en ciertas bacterias como moléculas libres (2).

El meristemo apical de la raíz es el principal lugar de síntesis de citocininas en plantas. Las citocininas son transportadas por el xilema y el floema (2).

#### b. **Mecanismos de acción de las citocininas**

Las hormonas, de una manera general probablemente se integran con receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Recientemente fue identificada una proteína que

actúa como receptor para una citocinina a la cual fue denominada Cytokinin binding Factor (CBF1). Se sugiere que este receptor sea una proteína del ribosoma y que este complejo citocinina receptor regula la síntesis de proteínas.

Existen indicativos de que las citocininas aumentan la concentración de calcio en el citoplasma, promoviendo su absorción del medio externo. El calcio a través de la unión con la proteína calmodulina. La calmodulina es inactiva como regulador, pero el complejo Calmodulina –Calcio puede activar un gran número de enzimas. Las citocininas parecen estimular la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto, estabilizando ciertos mRNAs específicos que tienen su degradación difícil (2).

### **c. Efecto de las citocininas en cultivo de tejidos vegetales**

- i.** Estimulación de la división celular
- ii.** Formación de brotes adventicios
- iii.** Promueven la formación de callos embriogénicos
- iv.** Uso en cultivo de Brotes
- v.** Proliferación de brotes adventicios
- vi.** Formación de yemas adventicias de brote
- vii.** Inhibición de formación de raíz (2).

### **C. Giberelinas**

Promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado. Las giberelinas se caracterizan por estimular la división y/o incremento celular. Se han encontrado más de 20 giberelinas diferentes en el reino vegetal, todas ellas caracterizadas por poseer en su estructura un esqueleto gibano (28).

Mroginski y Roca (22) indican que las concentraciones de giberelinas varían de 0.01 a 1.0mg/l, con un punto óptimo alrededor de 0.1mg/l para la mayoría de cultivos, los niveles superiores a 1.0 mg/l, resultan tóxicos. La más conocida de las giberelinas es la giberelina 3 (GA<sub>3</sub>) o ácido giberelico.

#### **a. Sitio de síntesis y transporte de las giberelinas**

Los órganos que poseen mayores concentraciones de giberelina son probablemente los lugares de biosíntesis, estos incluyen semillas en germinación, endospermo, frutos inmaduros y ápices de brotes y raíces. A nivel, intracelular, los plastidios son sitios de biosíntesis.

Las giberelinas son encontradas en concentraciones relativamente elevadas en la savia bruta, indicando transporte eficiente de los sitios de biosíntesis en las raíces hasta la parte aérea vía xilema. Las giberelinas también son encontradas en el floema, donde ocurre el transporte de las hojas hacia otras partes de la planta (2).

**b. Mecanismos de acción de las giberelinas**

Aún no ha sido identificado un receptor para las giberelinas. El estímulo de la expansión celular observado cuando GA<sub>3</sub> es aplicado a hipocotilos, no es acompañado por acidificación de la pared celular, indicando un mecanismo de acción diferente al de las auxinas (2).

El efecto clásico de las giberelinas es la inducción de síntesis de la enzima  $\alpha$ -amilasa en semillas de cereales en germinación, depende la síntesis de mRNA, indicando la giberelina al nivel de transcripción de genes específicos para la  $\alpha$ -amilasa. La inhibición de la síntesis de proteínas antes de aplicar la giberelina causa también la inhibición del efecto de la hormona sobre la  $\alpha$ -amilasa. Esta evidencia sugiere que alguna proteína es sintetizada después de la aplicación de la giberelina, y que esta proteína a su vez, induce la transcripción de dos familias de genes de  $\alpha$ -amilasa y de otros genes afectados simultáneamente. En realidad un gran número de enzimas aumentan su actividad después del tratamiento de semillas con giberelinas (2).

**c. Efectos del ácido giberélico en cultivo de tejidos vegetales**

- i. Formación de brotes adventicios
- ii. Rizogenesis
- iii. Embriogenesis y desarrollo de embriones
- iv. Diferenciación celular
- v. Actividad enzimática
- vi. Uso en cultivo de meristemos, brotes y nudos
- vii. Multiplicación de brotes
- viii. Alargamiento de brotes
- ix. Integridad apical
- x. Efectos detrimentales (2).

**D. Ácido abscisico**

Se utiliza en casos muy especiales; estimula la sincronización durante la embriogenesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento (28).

### 3.1.8 AMINOÁCIDOS

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor (28).

### 3.1.9 CARBOHIDRATOS

Son utilizados como fuentes de energía y como reguladores osmóticos. Sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa, manosa y lactosa. La concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 20 a 45 g/l (28).

### 3.1.10 AGUA

Aun cuando ya se discutió el papel que juega el agua en las técnicas de cultivo de tejidos, se considera pertinente recalcar que el agua utilizada para la preparación de soluciones debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada, de cualquier forma el empleo de un destilador de vidrio es requerido en la destilación final (28).

### 3.1.11 AGENTES SOLIDIFICANTES

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de “soporte” para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa el agar son:

- A. Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C. Esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- B. El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- C. El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- D. No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Otros compuestos se han empleado para substituir el agar; sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que ha alcanzado mas popularidad es el “Gelrite”. Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir este soporte (28).

### **3.1.12 SUPLEMENTOS NO DEFINIDOS**

Algunos de los suplementos no definidos son los siguientes:

- A.** Extracto de levadura.
- B.** Jugos y extractos de varios frutos (plátano, tomate y agua de coco).
- C.** Caseína hidrolizada (proteínas).
- D.** Antioxidantes, como el ácido ascórbico, y
- E.** Absorbentes como el carbón activado (28).

## 3.2 MARCO REFERENCIAL

### 3.2.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dentro del campus central de la Ciudad universitaria Zona 12, así como en el Umbráculo destinado para plantas medicinales de la FAUSAC (CEDIA).

### 3.2.2 EL CICLO VITAL DE UN HELECHO

La planta del helecho representa la generación esporofito. La parte inferior de las fronda lleva a menudo *áreas negruscas o de color café o anaranjado llamadas soros, los cuales son un conjunto de esporangios que sostienen las esporas haploides*. Las células madres de las esporas sufren meiosis dentro del esporangio y producen las esporas (principio de la generación gametofita) las cuales pueden ser del mismo tipo (homosporas) o de dos tipos diferentes (heterosporas), hecho que depende de la especie. Las diversas especies de helechos también difieren en la distribución, estructura y forma de soros y esporangios. En ciertos helechos, cada soro está cubierto por una estructura llamada indusio. En algunos otros existen dos tipos de hojas; las que llevan los soros (o esporofilas) y las vegetativas que nunca producen esporas.

Las esporas liberadas germinan en el medio húmedo y se desarrollan formando primero filamentos de células verdes con rizoides. Cada uno de estos filamentos forma un pequeño gametofito típico en forma de corazón llamado protalo el cual es una lámina verde pluricelular. Posee rizoides, así como órganos sexuales femeninos y masculinos colocados en la superficie inferior. El gametofito maduro tiene aproximadamente ½ centímetro de diámetro y lleva sus arquegonios, semejantes a los de las briófitas, cerca de la muesca, mientras que los anteridios están dispersos entre los rizoides. En ciertas especies los anteridios y arquegonios se encuentran en gametofitos distintos. Los espermatozoides multiciliados son liberados del anteridio, nadan hacia el protalo y penetran el arquegonio, sucediéndose así en la fecundación. El cigoto o huevo resultante marca el principio de la generación esporofítica y es retenido dentro del arquegonio donde se desarrolla, formando primero un embrión y después un nuevo esporofito con raíces, tallos y hojas. Durante los primeros estados del desarrollo embrionario, hasta que aparecen las primeras raíces y hojas, este esporofito joven depende totalmente para su nutrición del diminuto gametofito (25).

En la Figura 2 se presenta en forma resumida el ciclo sexual de los helechos en general.

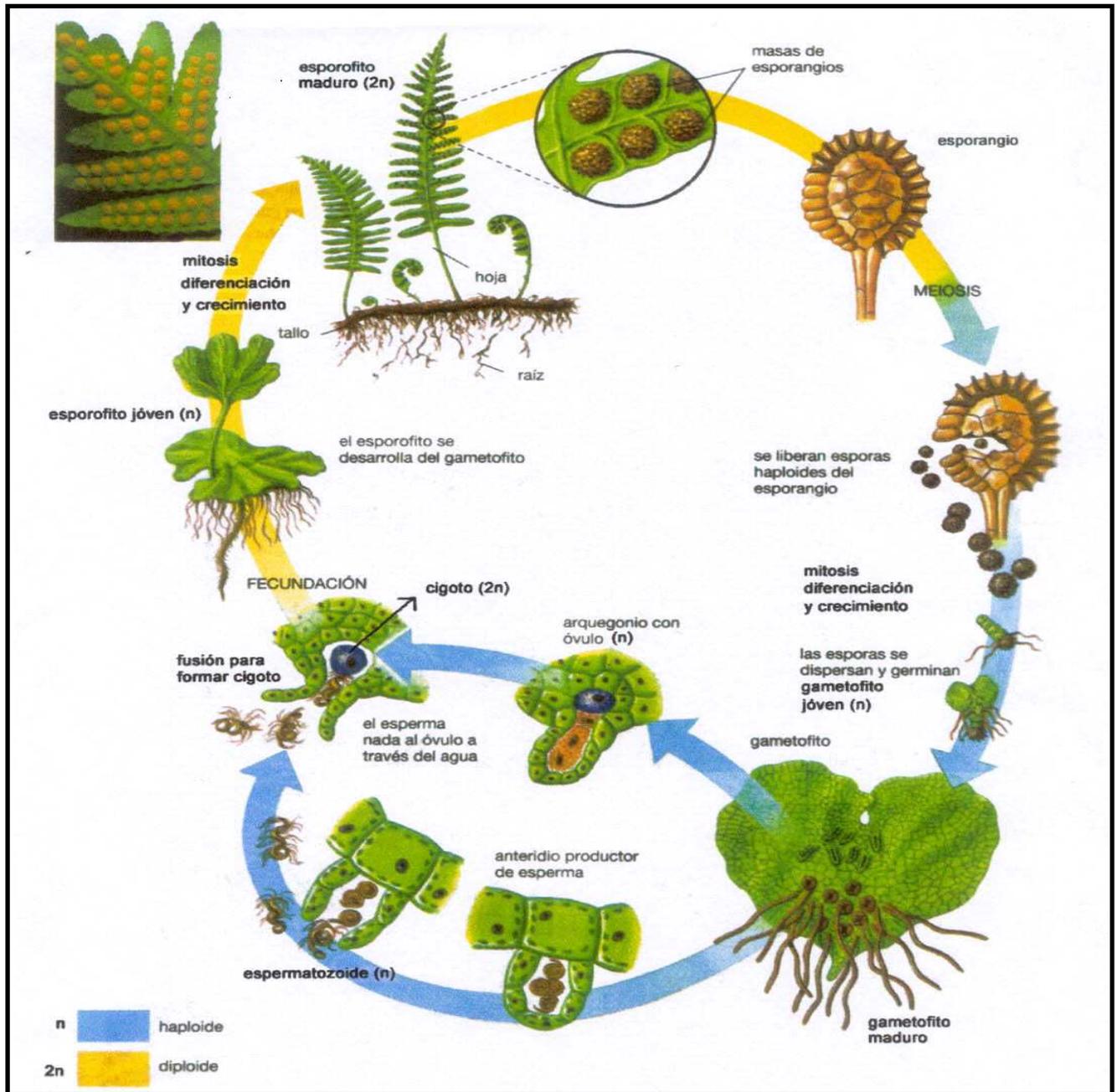


Figura 2. Ciclo general de los helechos (18)

### A. Reproducción natural de la calahuala

En Guatemala la calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger, se reproduce naturalmente por rizomas con un crecimiento de 20 a 30 cm en dos años y por esporas en un tiempo de 4 a 5 años para formar un helecho adulto.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Martínez V. Catedrático FAUSAC, octubre 2005. Consulta personal.

### 3.2.3 MICROPROPAGACIÓN DE LOS HELECHOS

Actualmente algunos helechos es posible micropropagarlos por medio de cultivo de esporas y por cultivo de brotes.

#### A. Cultivo de esporas *in vitro*

Las esporas de los helechos, que son bastante pequeñas pueden ser esterilizadas y manejadas de la misma manera como las semillas de las orquídeas, pero como algunas son resistentes a la humedad es importante adherir una solución húmeda de hipoclorito, luego sacudir bien el recipiente que contiene las esporas durante la esterilización (11).

Las esporas asépticas de los helechos pueden ser germinadas *in vitro*, si son colocadas en un medio semi-sólido, conteniendo una baja concentración de sales, y si son convenientemente sembradas dentro de tubos de ensayo largos. La composición exacta del medio de soporte para la germinación de esporas en realidad no es tan complicada, puede o debe contener una relativa baja cantidad de concentración de iones. Algunos medios, que han sido usados con buenos resultados son  $\frac{1}{2}$  Knudson 1946 (14) con macronutrientes más micronutrientes Steeves *et al.* 1955 (26), el medio de Moore 1903 (21) a mitad Freeberg and Wetmore, 1957 (10) o a toda fuerza, y Miller y Miller 1961 (19) el cual también puede ser improvisado por la adición de micronutrientes. Las sales de White 1954 (32) medio que probablemente puede ser satisfactorio. La adición de vitaminas o reguladores de crecimiento puede ser no necesaria. Los azúcares probablemente no son requeridos para la germinación de esporas, pero el crecimiento de los gametofitos son más rápidos cuando están presentes los azúcares. Una baja concentración de glucosa o sucrosa (e.g. 2.5-20g/l) es usualmente empleada (11).

Los cultivos son mantenidos en luz de baja irradiación. La óptima temperatura de incubación es variable de acuerdo al hábitat natural de las distintas especies de los helechos. J.H. Miller 1968 (20) encontró que la germinación de algunas especies depende de la densidad a la cual las esporas fueron inoculadas dentro del medio. Cuando se establecen los medios de cultivo es aconsejable poner los tubos en el cual el número de esporas por unidad de área han variado (11).

Las esporas germinadas dan a crecer protalos no vasculares. Los esporofitos son usualmente producidos después en el mismo recipiente, pero no serán obtenidos en caso que no haya suficiente agua libre que permita el movimiento de los gametos masculinos. La fertilización puede ser asistida si una pequeña

cantidad de agua esterilizada es introducida dentro de los recipientes de cultivo por medio de una jeringa en un estado apropiado del desarrollo del gametofito (11).

Aunque el tejido gametofito no produzca esporofitos en su forma normal, puede todavía ser usada para la micropropagación por medio de la apogamia y aposporia. En algunas circunstancias, el tejido esporofito de los helechos puede producir gametofitos sin primero producir esporas. Esta circunstancia es llamada aposporia. Similarmente esporofitos algunas veces crecen del tejido gametofito sin que haya sucedido fertilización lo que llamamos (apogamia) Estos eventos pueden ser rápidamente observados y manipulados durante el cultivo *in vitro* (11).

## **B. Cultivos de brotes**

Los esporofitos de algunos helechos pueden ser propagados en cultivo de brotes usando puntas o extremos de brotes, o las puntas de las yemas laterales de los estolones o rizomas, como explantes iniciales. El grado de contaminación de la superficie de los estolones o rizomas puede ser reducido creciendo plantas madres en canastas colgantes. El cultivo de brotes es puesto en paréntesis porque frecuentemente la multiplicación de brotes no es enteramente por proliferación de brotes axilares. Hennen y Shehan 1978 (12) reportaron que en *Platycerium*, la multiplicación de brotes ocurría por formación directa de yemas adventicias en base de explantes originales y en raíces y frondas producidas *in vitro*. En *Nephrolepis exaltata*, Loescher y Albrecht 1978 (16) encontraron que el grado de formación directa de brotes adventicios en los rizomas de las puntas de los explantes, dependía del grado de concentración de sales en el medio MS, fue alta cuando la concentración de macronutrientes fue reducida a la mitad, y 2% de sucrosa fue adherida, pero solamente un pequeño número de brotes adventicios fueron producidos en el medio completo o si ½ de sal del medio contenía 3 o 4% de sucrosa.

Rangos de multiplicación en cultivo de brotes son usualmente muy rápidos, y con los helechos de Boston es posible obtener 37,500 plantas de 100 estolones, puntas de explantes arriba de un periodo de 9 meses. La micropropagación con esta significancia ha venido a ser el método más exitoso de multiplicación vegetativa para muchos helechos, la cual en consecuencia ha llegado a ser disponible como plantas de follaje (4).

### 3.2.4 CARACTERÍSTICAS DE LA CALAHUALA *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger

#### A. Clasificación taxonómica

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Reino:</b>           | Plantae  |
| <b>División:</b>        | Polypodiophyta   |
| <b>Clase:</b>           | Polypodiopsida   |
| <b>Familia:</b>         | Polypodiaceae  |
| <b>Género:</b>          | Phlebodium   |
| <b>Especie:</b>         | <b><i>Phlebodium pseudoaureum</i> (Cav.) Lellinger</b> |
| <b>Nombres comunes:</b> | Calaguala, calahuala, polipodio (8, 27).               |

#### B. Descripción botánica de la calahuala

##### a. Rizomas

Los rizomas son rastreros de uno a dos centímetros de grosor recubiertos densamente por escamas; las escamas son de forma linear-lanceoladas, delgadas, de color naranja a ferruginosas y traslucidas de 0.5 a 1.5 centímetros de largo, con márgenes cortamente ciliados. Los rizomas presentan meristemas (brotes) que se diferencian para formar frondes, la distancia entre meristemas sobre el rizoma es de 1.5 a 2 centímetros.

##### b. Frondes

Los frondes se encuentran dispersos a lo largo de los rizomas; se presentan frondes fértiles (que presentan en el envés soros) y estériles (sin soros). Los frondes según su estado de desarrollo pueden medir hasta 120 centímetros de largo desde la base del rizoma hasta la parte final de la lámina frondal. El fronde se divide en el estipe (pecíolo) y la lámina frondal que es pinnada. El fronde es imparapinado, un fronde adulto tiene de 25 a 29 pinnas. Un estipe de un fronde adulto llega a medir hasta 30 centímetros de largo, es de color café rojizo con un diámetro en la base de 0.5 centímetros. La lámina del fronde mide de la base al ápice 45 centímetros, las pinnas basales miden 26 centímetros de longitud desde la aurícula (lóbulo basal de una pinna) hasta el ápice. En su parte más ancha el fronde mide 42 centímetros.

#### C. Distribución geográfica de la calahuala

Crecen silvestres en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada, en lugares de gran humedad a la sombra. Se encuentran desde México y Centro hasta Sur América en alturas de 1200-

2,200 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (5).

#### **D. Usos medicinales atribuidos a la calahuala**

La infusión y decocción del rizoma se usa oralmente para tratar afecciones gastrointestinales (diarreas, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis); respiratorias (asma, tos, tos ferina) y cardíacas, dolor de huesos, reumatismo, diabetes, gota, hipertensión, purificar la sangre, parásitos, enfermedades venéreas, sífilis, y afecciones renales (cálculos, hidropesía) (5).

Tópicamente se usa la infusión en emplasto y cataplasma para el tratamiento de contusiones, reumatismo, úlceras, quebraduras, cáncer, cierto tipo de tumores, psoriasis y eczema. La decocción de las hojas se usa para detener las hemorragias (5).

Se le atribuye propiedad analgésica, antihemorrágica, depurativa, diurética, desinflamante, emenagoga, espasmolítica, expectorante, febrífuga, laxante, pectoral, purgante, sudorífica y tranquilizante (5).

#### **3.2.5 CONDICIONES CLIMÁTICAS PARA LA PROPAGACIÓN DE LA CALAHUALA**

**Luz:** Crecen bien en luz media; no toleran luz solar directa, necesitan de bastante humedad del ambiente para reproducirse (9).

**Fotoperiodo:** Crecen activamente durante todo el año, aunque más lentamente en los meses de días cortos (9).

**Temperatura:** Toleran temperaturas inferiores a 10°C, siempre que se mantengan más secas que lo normal. Cuando las temperaturas superan los 20°C, debe incrementarse la humedad de las plantas, situando las macetas sobre bandejas húmedas o haciendo riegos sobre el sustrato y aplicando nebulizaciones diarias de agua sobre el follaje. Efectúese una nebulización fina, para que no se depositen gotas que podrían decolorar las hojas. Las temperaturas adecuadas para su desarrollo son alrededor de 19°C a 24° C en condiciones normales (9).

**Riego:** Necesitan de riego abundante a fin de que se mantenga siempre húmedo el sustrato (9).

**Sustratos:** En condiciones naturales los *Phlebodiums* crecen silvestres en troncos de palmas, árboles de encino y roca caliza desintegrada. O sea que se recomienda utilizar broza de encino cernida puede contener piedra caliza desintegrada, desechos de palma que ya sé esta experimentando en Honduras con el fin de que el rizoma tenga espacio suficiente para extenderse, ramificarse y absorber humedad del sustrato (5, 9).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento sobre la propagación de la calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) **Lellinger** a través de identificar cual de los tres explantes: esporas, ápices de brote y primordios foliares es el más apropiado para la propagación *in vitro* de calahuala hasta la fase de multiplicación en distintos medios de cultivo.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Establecer la respuesta de la calahuala a la micropropagación *in vitro* utilizando esporas.
- 4.2.2 Establecer la respuesta de la calahuala a la micropropagación *in vitro* utilizando ápices de brote.
- 4.2.3 Establecer la respuesta de la calahuala a la micropropagación *in vitro* a partir de primordios foliares.

## 5. HIPÓTESIS

- 5.1 Los explantes de esporas de calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) **Lellinger** responderán positivamente a la micropropagación *in vitro* de igual forma en cualquier medio de cultivo.
- 5.2 Los explantes de ápices de brote de calahuala responderán positivamente a la micropropagación *in vitro* de igual forma en cualquier medio de cultivo.
- 5.3 Los explantes de primordios foliares de calahuala responderán positivamente a la micropropagación *in vitro* de igual forma en cualquier medio de cultivo.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 ÁREA EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. El mismo está equipado con condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y con los requerimientos adecuados que permitan la ejecución de la presente investigación..

### 6.2 INSTRUMENTOS, EQUIPO, CRISTALERÍA Y REACTIVOS

Para la presente investigación se utilizó instrumentos, equipo, cristalería, reactivos e insumos que a continuación se describen:

#### 6.2.1 INSTRUMENTOS

Mechero de alcohol, para flamear instrumentos, pipetas, pinzas grandes y pequeñas, agujas de disección, tijeras, espátulas, mangos para bisturís, hojas de bisturís, pizetas, recipientes de plásticos, papel parafilm, papel filtro.

#### 6.2.2 EQUIPO

Una unidad de cámara de flujo laminar, autoclave, balanza analítica, estufa-Agitador, agitadores magnéticos, refrigeradora, potenciómetro, microondas, horno de esterilización en seco.

#### 6.2.3 CRISTALERÍA

Beaker, Erlenmeyer, tubos de ensayo, balones aforados, recipientes para guardar soluciones concentradas, pipetas graduadas, cajas de petrí, esterilizadas, recipientes de vidrio para los medios de cultivo.

#### 6.2.4 REACTIVOS

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KI, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>.EDTA, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, Myo-inositol, Ácido nicotínico, Pyridoxina-HCl, Thiamina-HCl, Glicina, Ácido cítrico, Sacarosa.

### 6.3 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se dividió en dos fases principales como sigue: **Fase de Campo:** recolección en campo e incremento de plantas donantes de explantes de calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) **Lellinger** y **Fase de Laboratorio:** propagación de plantas de calahuala por medio de cultivo de tejidos a través de tres tipos de explante (esporas, brotes y primordios foliares) en distintos medios de cultivo.

### 6.4 FASE DE CAMPO: RECOLECCIÓN EN CAMPO E INCREMENTO DE PLANTAS DONANTES DE EXPLANTES DE CALAHUALA

La primera fase fue de suma importancia, porque por medio de su ejecución se aseguró obtener la suficiente cantidad de explantes (esporas, brotes y primordios foliares) para la segunda fase de laboratorio que consistió en la propagación de los mismos en distintos medios de cultivo. En términos generales esta fase incluyó:

#### 6.4.1 RECOLECCIÓN DE CALAHUALA EN EL CAMPO

El material vegetal se obtuvo de poblaciones silvestres de calahuala que crecen en la aldea La Ciénaga, San José Pinula, Guatemala. Para tal propósito se visitó el lugar y se obtuvo plantas completas de calahuala, las que se trasladaron posteriormente al umbráculo (para que no esté expuesto a la luz directa por tratarse de un helecho) ubicado en los campos del Centro Experimental Docente de Agronomía.

#### 6.4.2 SIEMBRA DE PLANTAS DONANTES DE EXPLANTES

Para esta actividad se emplearon camas de 4 m de largo y 1 m de ancho, con una profundidad de 0.15 m. En el fondo de la cama se colocó arena blanca para que existiera un drenaje adecuado y sobre ésta una mezcla de broza de encino molida y material vegetal proveniente del bosque en donde se encuentran los rizomas de calahuala (musgo, ramas viejas, bromelias). Ya preparado el sustrato dentro de las camas se procedió a colocar los rizomas de calahuala a una profundidad de 2.5 centímetros bajo la superficie, a una distancia de 8 centímetros entre hileras a fin de formar 10 hileras de rizomas en la cama tal como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3.** Cama de incremento de calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger que se ubicó dentro del umbráculo

#### **6.4.3 MANEJO AGRONÓMICO DE LAS PLANTAS DONANTES DE EXPLANTES**

El manejo agronómico de las plantas de calahuala donantes de explantes consistió en riegos, fertilización y control de malezas.

##### **A. Riego**

El primer riego se realizó inmediatamente después de la siembra de los rizomas de calahuala; luego se regó cada dos días a fin de mantener una adecuada humedad dentro del sustrato.

##### **B. Fertilización**

No se utilizó fertilizante debido a que se empleó un buen contenido de materia orgánica en el sustrato donde se desarrollaron los rizomas.

##### **C. Control fitosanitario**

Para el control de enfermedades, se aplicó Mancozeb a razón de 50 cc por bomba de 16 litros para evitar la pudrición del rizoma y el daño de algunos hongos como: *Rhizoctonia solani* y *Pythium sp*, los cuales

son comunes en etapas de invernadero y umbráculos. Para el control de ácaros se aplicaron 25 cc de Sistemín por bomba de 16 litros.

Luego se elaboró un programa de fumigación para la desinfección de las plantas en el umbráculo el cual consistió en aplicaciones quincenales de los siguientes productos Sistemín y Azufre para eliminación de ácaros o insectos y enfermedades fungosas.

#### **D. Control de malezas**

A los 20 días de sembrados los helechos de calahuala se realizó una limpia manual para eliminar unas escasas plantas del género *Melampodium* que se presentaron.

### **6.5 FASE DE LABORATORIO: PROPAGACIÓN DE PLANTAS DE CALAHUALA**

En esta fase se evaluó la respuesta a la propagación por medio de cultivo de tejidos de tres tipos de explantes de calahuala. La metodología a seguir para evaluar la respuesta a la propagación por medio de cultivo de tejidos para los explantes de esporas, ápices de brotes y primordios foliares se presenta a continuación.

#### **6.5.1 PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ESPORAS**

##### **A. Tratamientos**

Para la propagación de calahuala por medio de esporas se empleó el medio de cultivo Murashige y Skoog 1962 (24) a cuatro concentraciones distintas. Cada una de las concentraciones del medio Murashige y Skoog (1962) se constituyó en un tratamiento tal como se indica a continuación:

**Tratamiento 1 (T1):** Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 100 por ciento.

**Tratamiento 2 (T2):** Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 75 por ciento.

**Tratamiento 3 (T3):** Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 50 por ciento.

**Tratamiento 4 (T4):** Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 25 por ciento.

Una descripción más amplia de los componentes y las concentraciones que incluye cada uno de los cuatro tratamientos se presenta en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Dosis en mg/L de cada componente del medio MS para cada uno de los 4 tratamientos**

| Componentes del medio<br>Murashige y Skoog | DOSIS DE CADA COMPONENTE (mg/l) |           |          |          |
|--|---------------------------------|-----------|----------|----------|
|  | T1 = 100%                       | T2 = 75%  | T3 = 50% | T4 = 25% |
| NO <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>            | 1,650.000                       | 1,237.500 | 825.000  | 412.500  |
| KNO <sub>3</sub>                           | 1,900.000                       | 1,425.000 | 950.000  | 475.000  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>            | 170.000                         | 127.500   | 85.000   | 42.500   |
| MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O       | 370.000                         | 277.500   | 185.000  | 92.500   |
| CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O       | 440.000                         | 330.000   | 220.000  | 110.000  |
| FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O       | 27.800                          | 20.850    | 13.900   | 6.950    |
| Na <sub>2</sub> EDTA                       | 37.300                          | 27.975    | 18.650   | 9.325    |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>             | 6.200                           | 4.650     | 3.1000   | 1.550    |
| MnSO <sub>4</sub> • 4H <sub>2</sub> O      | 22.300                          | 16.725    | 11.150   | 5.575    |
| ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O       | 10.600                          | 7.950     | 5.300    | 2.650    |
| KI   | 0.830                           | 0.623     | 0.415    | 0.207    |
| NaMoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O     | 0.250                           | 0.188     | 0.125    | 0.062    |
| CuSO <sub>4</sub> •5 H <sub>2</sub> O      | 0.025                           | 0.019     | 0.013    | 0.006    |
| CoCl •6 H <sub>2</sub> O                   | 0.025                           | 0.019     | 0.013    | 0.006    |
| Thiamina-HCL                               | 0.100                           | 0.075     | 0.050    | 0.025    |
| ACIDO NICOTÍNICO                           | 0.500                           | 0.375     | 0.250    | 0.125    |
| MYO-INOSITOL                               | 100.000                         | 75.00     | 50.000   | 25.000   |
| GLICINA                                    | 2.000                           | 1.500     | 1.000    | 0.500    |

## B. Unidad experimental

La unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de esporas la constituyó un frasco de 125 ml de capacidad con 25 ml del medio de cultivo y sobre éste se depositaron 4 soros tal como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4. Unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de esporas**

### C. Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales

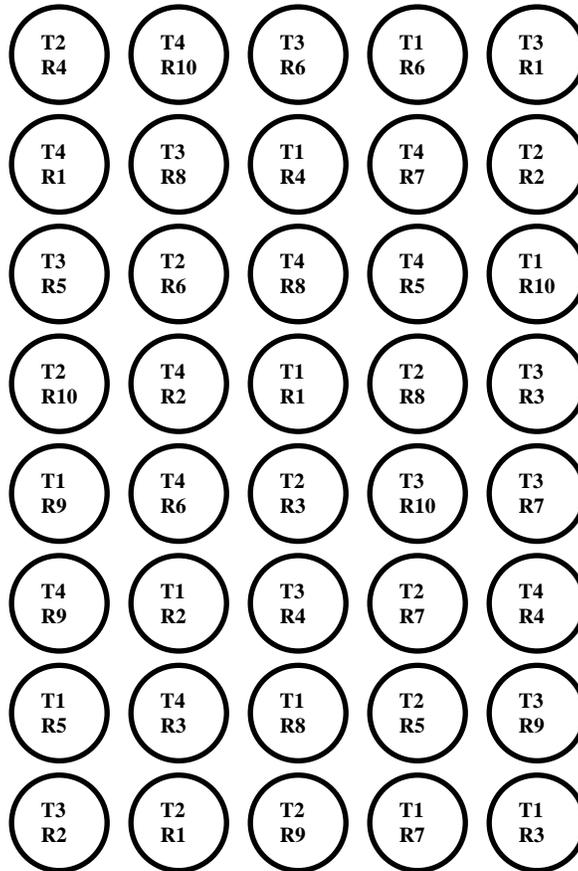
El diseño experimental fue el de una distribución completamente al azar con cuatro tratamientos y 10 repeticiones (40 unidades experimentales) que corresponde al modelo estadístico que se presenta a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

**Donde:**

- $Y_{ij}$**  = Variable respuesta de la  $ij$ -ésima unidad experimental.  
 **$\mu$**  = Efecto de la media general.  
 **$T_i$**  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel de concentración de MS.  
 **$B_j$**  = Efecto del  $j$ -ésima repetición.  
 **$E_{ij}$**  = Error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental.

La distribución de las unidades experimentales se esquematiza en la Figura 5.



**Figura 5.** Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala por medio de esporas.

**D. Variables de respuesta****a. Número de esporofitos jóvenes por unidad experimental**

A los 210 días después de la siembra de las esporas se extrajeron todos los esporofitos jóvenes del frasco de 125 ml y luego se trasladaron a cajas de petri donde se separaron todos los esporofitos a fin de facilitar el conteo (Figura 19 c). Luego se procedió a registrar los datos de la variable número de esporofitos por unidad experimental de cada tratamiento y repetición en un formato como el que se presenta en el Cuadro 2.

**b. Altura promedio (cm) de esporofito joven**

Los esporofitos jóvenes separados en las cajas de petri se colocaron sobre la mesa de trabajo y por medio de una regla se midió desde su base hasta el ápice la longitud en centímetros. Se midió la altura de todos los esporofitos presentes en cada frasco y luego se obtuvo la altura promedio dividiendo la sumatoria total entre el número total de esporofitos (Figura 19 b). Luego se procedió a registrar los datos de la variable altura promedio de esporofitos de cada tratamiento y repetición en un formato como el que se presenta en el Cuadro 2

**E. Manejo del experimento**

El manejo del experimento incluyó en forma secuencial: la preparación de los medios de cultivo, la obtención y desinfección de soros de las plantas donantes, la siembra de los soros en las unidades experimentales, el licuado de los protalos.

**a. Preparación de los medios de cultivo y llenado de los frascos**

Para la preparación del medio de cultivo se tomaron las cantidades alícuotas (mg/L) de cada componente del medio Murashige y Skoog (1962) que se indica en el Cuadro 1; es decir se preparó un litro de medio de cultivo MS para cada tratamiento. Cada uno de los componentes se diluyó uno a uno en 1000 cc de agua dentro de un beakers el cual se colocó sobre una agitadora mecánica a fin de realizar una mezcla uniforme. Luego de haber mezclado todos los componentes del medio MS se procedió a aplicar un suplemento de sacarosa (30 mg/l) y dos de reguladores de crecimiento.

Finalmente para cada uno de los cuatro tratamientos se procedió a aplicar 25 ml de medio de cultivo a cada uno de los 10 frascos; es decir que de cada litro de medio de cultivo, para el llenado de los frascos, se emplearon 250 ml.

### b. Obtención y desinfección de soros de las plantas donantes

Los soros se obtuvieron de las plantas de calahuala donantes que se incrementaron en el umbráculo del Centro Experimental Docente de Agronomía. De las plantas establecidas en el umbráculo se cortaron los frondes (Pinas) después de la tercera aplicación de Sistemin y Azufre y se llevaron al laboratorio en bolsas plásticas esterilizadas con alcohol etílico al 70 % para esto se asperjó el interior de las mismas y a las pinas se les envolvió en papel mayordomo remojado con agua autoclaveada para esto se utilizó una pizeta plástica, ya en el laboratorio se extrajeron los soros para esto se puso papel mayordomo de fondo y papel encerado encima para facilitar el deslizamiento de los soros hacia las bolsitas de papel filtro con un bisturí y una pequeña cuchara previamente autoclaveados se extrajo un total de 160 soros de las pinas así como se muestra en la Figura 6. Los soros se desinfectaron con una solución de alcohol etílico al 70 % por 2 minutos, luego se retiró el exceso de alcohol por medio de un enjuague con agua destilada y se sumergieron dentro de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 minutos, finalmente se retiró el exceso de hipoclorito de sodio enjuagando con agua destilada estéril tres veces.



a) Obtención de los soros del fronde



b) Traslado de soros a bolsas de papel filtro



c) Sellado de bolsas de papel filtro con soros



d) Desinfección de soros con papel filtro

**Figura 6. Obtención y desinfección de soros de plantas donantes.**

**c. Siembra de los soros en los frascos**

Se procedió a colocar los soros ya desinfectados en los frascos con el medio de cultivo, colocando 4 soros por frasco bajo condiciones de baja intensidad de luz y a una temperatura de 25°C.

**d. Incubación de los medios de cultivo y transferencia o subcultivos**

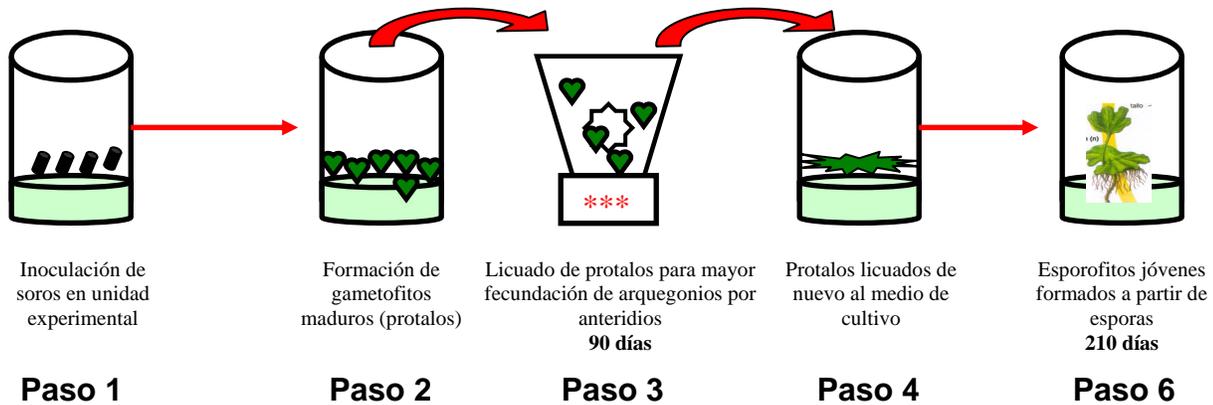
Las cuarenta unidades experimentales, previamente identificadas con el número de tratamiento y repetición fueron trasladadas a un anaquel del cuarto de crecimiento y se distribuyeron sobre éste de acuerdo a la indicado en la Figura 5. Las condiciones de incubación que se proporcionaron fueron de luz blanca proveniente de lámparas de neón con una intensidad de 1000 a 3000 lux aproximadamente, temperatura media de 20°C y fotoperíodo de 16 horas luz.

**e. Licuado de los protalos**

Los helechos son inusuales, pueden ser regenerados de tejidos macerados (5), en este ensayo a los 90 días después de la siembra de los soros se procedió a hacer un licuado de los protalos formados con agua esterilizada con el objetivo de que haya una mayor fecundación de los anteridios con los arquegonios y así obtener la mayor cantidad posible de esporofitos

Luego de la operación anterior se procedió a dispersar el licuado obtenido nuevamente en los frascos con los medios de cultivo hasta obtener los esporofitos jóvenes según corresponda a cada tratamiento y repetición como se ilustra en la Figura 5.

Todo el proceso de manejo del experimento desde la inoculación de los cuatro soros en las unidades experimentales (medios de cultivo) hasta la formación de esporofitos jóvenes para la medición de las variables de respuesta se esquematiza en la Figura 7.



**Figura 7.** Secuencia desde la inoculación de soros hasta la obtención de esporofitos jóvenes de calahuala.

**F. Toma y registro de datos**

Los datos que se registraron del experimento corresponden a cada una de las dos variables de respuesta planteadas en el inciso D (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Formato para registrar el número de esporofitos jóvenes y altura promedio (cm) por unidad experimental.

| TRATAMIENTOS  | REPETICIONES |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |     |     |  |
|---------------|--------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|-----|--|
|               | R1           |     | R2 |     | R3 |     | R4 |     | R5 |     | R6 |     | R7 |     | R8 |     | R9 |     | R10 |     |  |
|               | NE           | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE | Alt | NE  | Alt |  |
| T1 (MS 100 %) |              |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |     |     |  |
| T2 (MS 75 %)  |              |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |     |     |  |
| T3 (MS 50 %)  |              |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |     |     |  |
| T4 (MS 25 %)  |              |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |    |     |     |     |  |

**Referencias:** NE = número de esporofitos jóvenes por unidad experimental; Alt = altura promedio de esporofitos jóvenes por unidad experimental.

**G. Análisis de la información**

Para el presente ensayo se realizó un análisis de varianza para el modelo de una distribución completamente al azar con cuatro tratamientos y diez repeticiones, también los datos de las dos variables de respuesta se sometieron a un análisis de normalidad. Luego resultando significativos los ANDEVAS de las variables de respuesta se procedió a realizar la prueba múltiple de medias de Tukey con una significancia del 5 % a fin de establecer que medio de cultivo es el más apropiado para cada variable en cuestión.

## 6.5.2 PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ÁPICES DE BROTE

### A. Tratamientos

Para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote se empleó el medio de cultivo Murashige (1974) (23) más dos reguladores del crecimiento en 7 combinaciones distintas de auxina y citocinina (ácido naftalenacetico “ANA” y Bencilaminopurina “BAP” respectivamente). Cada una de las combinaciones de ANA y BAP agregadas al medio Murashige se constituyó en un tratamiento (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tratamientos para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote**

| TRATAMIENTO | DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO |                             |                  |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
|             | MEDIO DE CULTIVO            | REGULADORES DEL CRECIMIENTO |                  |
|             |                             | AUXINA (ANA)                | CITOCININA (BAP) |
| 1           | Murashige                   | 0.00                        | 0.00             |
| 2           | Murashige                   | 0.01                        | 0.05             |
| 3           | Murashige                   | 0.01                        | 0.50             |
| 4           | Murashige                   | 0.01                        | 1.00             |
| 5           | Murashige                   | 0.50                        | 0.05             |
| 6           | Murashige                   | 0.50                        | 0.50             |
| 7           | Murashige                   | 0.50                        | 1.00             |

Una descripción de los componentes del medio de cultivo Murashige (1974) se presenta en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Dosis de cada componente del medio de cultivo Murashige (1974).**

| COMPONENTES   | MACRONUTRIENTES Murashige, <i>et al.</i> (1972)b (en mg/l) |
|---|--|
| KNO <sub>3</sub>                                    | 1900   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 1650   |
| CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O                | 440  |
| MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 370  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 170  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O  | 170  |
| COMPONENTES   | MICRONUTRIENTES Murashige & Skoog (1962) (en ug/l)         |
| MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O                | 22300  |
| ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 8600   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 6200   |
| KI  | 830  |
| CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O                | 25   |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O | 250  |
| CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O                | 25   |
| COMPONENTES   | SOLUCIÓN DE HIERRO (en ug/l)                               |
| FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 27850  |
| Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O              | 37250  |
| COMPONENTES   | SOLUCIÓN DE VITAMINAS Murashige & Skoog (1962) (µg/l)      |
| INOSITOL  | 100  |
| TIAMINA•HCL   | 100  |
| ACIDO NICOTÍNICO                                    | 500  |
| PYRIDOXINA•HCL                                      | 500  |
| COMPONENTES   | AMINOACIDOS Y COMPOSICION DE AMIDAS Skoog (1944) (µg/l)    |
| GLICINA   | 2.0  |

## B. Unidad experimental

La unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote fue un frasco de 125 ml de capacidad con 25 ml de medio de cultivo y dos ápices de brote (Figura 8).



**Figura 8.** Unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote.

## C. Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales

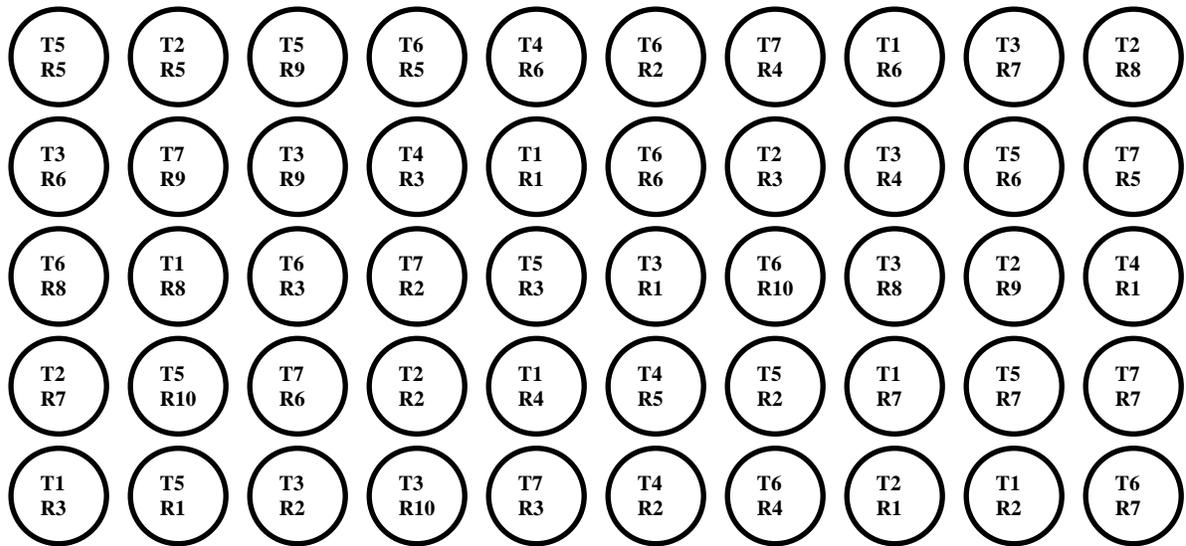
Siendo las condiciones de incubación homogéneas, se utilizó el diseño experimental completamente al azar con siete tratamientos y 10 repeticiones (70 unidades experimentales) que corresponde al modelo estadístico que se presenta a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

**Donde:**

- $Y_{ij}$**  = Variable respuesta de la  $ij$ -ésima unidad experimental.
- $\mu$**  = Efecto de la media general.
- $T_i$**  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel de concentración de MS.
- $B_j$**  = Efecto del  $j$ -ésima repetición.
- $E_{ij}$**  = Error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental.

La distribución de las unidades experimentales en el cuarto de crecimiento del laboratorio quedó como se esquematiza en la Figura 9.



**Figura 9. Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala por medio de ápices de brote.**

**D. Variables de respuesta**

- a. **Número de esporofitos jóvenes por unidad experimental.**
- b. **Altura promedio (cm) de esporofito joven.**

**E. Manejo del experimento**

Para realizar la propagación de calahuala a partir de ápices de brote se procedió en forma secuencial así: preparación de los medios de cultivo y llenado de los frascos, obtención y desinfección de ápices de brote en la cámara de flujo laminar, e inoculación e incubación de los ápices de brote.

**a. Preparación de los medios de cultivo y llenado de los frascos**

El medio de cultivo Murashige (1974) se preparó tomando las cantidades alícuotas de cada componente indicadas en el Cuadro 5, y colocándolas dentro de un beakers con 1000 mL de agua destilada el cual se colocó sobre una agitadora mecánica para obtener una mezcla uniforme. Luego de haber mezclado todos los componentes del medio de cultivo se procedió a agregar un suplemento de sacarosa (30 mg/l) y 1 g de agar como agente solidificante. Luego se agregó a cada 10 frascos la dosis de ANA y BAP que se indica en el Cuadro 4 de descripción de los tratamientos a fin de obtener los 7 tratamientos con 10 repeticiones cada uno.

**b. Obtención y desinfestación de ápices de brote**

Los ápices de brote se colectaron entre 7:00 y 8:00 a.m. de las plantas de calahuala ubicadas en el umbráculo. Se extrajeron los rizomas que tenían la mayor cantidad de ápices de brote y se trataron con una solución antifúngica de 300 ml compuesta por: 0.3 gr de cuprimicin, 0.45 gr de mancozeb, 1.2 gr de ácido cítrico, 0.6 gr de ácido ascórbico y 0.9 ml de tetraciclina.

Para evitar la oxidación que se produce después de 24 horas de cortados los ápices de brote se procedió a trabajarlos inmediatamente (siete horas después 3:00 p.m.). Al laboratorio de cultivo de tejidos de la FAUSAC se trasladaron los rizomas con ápices de brote y en la cámara de flujo laminar se les quitó el exceso de la solución antifúngica por medio de un lavado durante 5 minutos con hipoclorito de sodio al 2 por ciento, luego se lavó tres veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

Dentro de la cámara de flujo laminar se disectaron los explantes de ápices de brote, para lo cual se emplearon pinzas y bisturí obteniendo un total de 140 ápices de brote de 5 ml de ancho por 5 ml de largo que se colocaron inicialmente en cajas de petri; se removieron las vellosidades que contenían por medio de un bisturí (Figura 10).



**Figura 10. Disección de explantes de ápice de brote de calahuala en la cámara de flujo laminar.**

**c. Siembra de los ápices en los frascos**

Una vez todos los ápices de brote estaban libres de vellosidades se procedió a inocularlos en cada uno de los 70 frascos, colocando dos ápices de brote por frasco.

**d. Incubación de los medios de cultivo**

Las condiciones de incubación de los medios de cultivo con los ápices de brote fueron las mismas que se indican para la incubación de soros.

**F. Registro de datos y análisis de la información**

Como no se obtuvo respuesta a la propagación *in vitro* de calahuala en el medio de cultivo Murashige (1974) no hubo datos que registrar ni analizar estadísticamente.

**6.5.3 PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE PRIMORDIOS FOLIARES**

**A. Tratamientos**

Para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares se empleó el medio de cultivo de Wetmore 1954 (31) más dos reguladores del crecimiento en 7 combinaciones distintas de auxina y citocinina (ácido naftalenacético “ANA” y Bencilaminopurina “BAP” respectivamente). Cada una de las combinaciones de ANA y BAP agregadas al medio Wetmore se constituyó en un tratamiento tal como se indica en el Cuadro 5.

**Cuadro 5. Tratamientos para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares**

| TRATAMIENTO | DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO |                             |                  |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|
|             | MEDIO DE CULTIVO            | REGULADORES DEL CRECIMIENTO |                  |
|             |                             | AUXINA (ANA)                | CITOCININA (BAP) |
| 1           | Wetmore                     | 0.00                        | 0.00             |
| 2           | Wetmore                     | 0.01                        | 0.05             |
| 3           | Wetmore                     | 0.01                        | 0.50             |
| 4           | Wetmore                     | 0.01                        | 1.00             |
| 5           | Wetmore                     | 0.50                        | 0.05             |
| 6           | Wetmore                     | 0.50                        | 0.50             |
| 7           | Wetmore                     | 0.50                        | 1.00             |

Una descripción más amplia de los componentes y las concentraciones que incluye el medio de cultivo Wetmore se presenta en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Dosis de cada componente del medio de cultivo Wetmore 1954 (31).**

| COMPONENTES  | COMPOSICIÓN DE MACRONUTRIENTES 0.5 X MEDIO Knudson (1922, 1943) B (en mg/l) |
|--|---|
| $\text{KNO}_3$                                       | 250   |
| $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 1000  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$            | 250   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                             | 250   |

**B. Unidad experimental**

La unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares fue un frasco de 125 ml de capacidad con 25 ml de medio de cultivo y un explante de primordio foliar tal como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. Unidad experimental para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares.**

### C. Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales

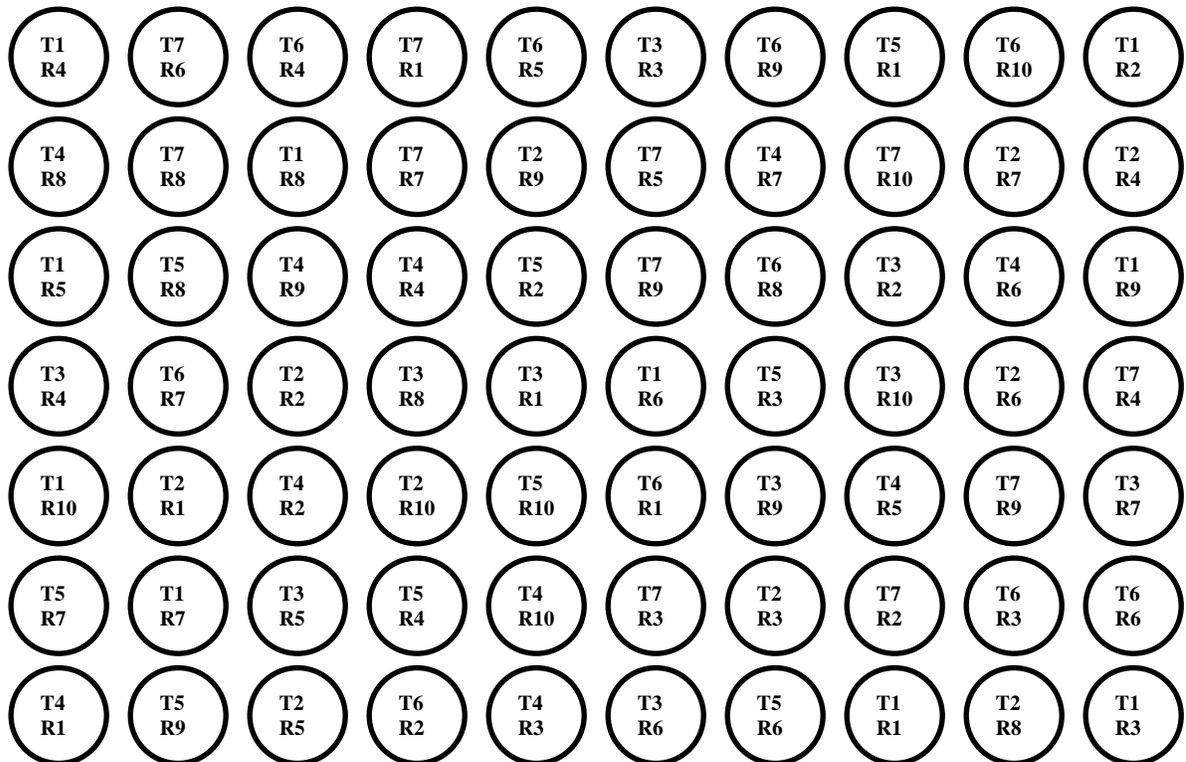
Siendo las condiciones de incubación homogéneas, se utilizó el diseño experimental completamente al azar con siete tratamientos y 10 repeticiones (70 unidades experimentales) que corresponde al modelo estadístico que se presenta a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

**Donde:**

- $Y_{ij}$**  = Variable respuesta de la ij-esima unidad experimental.  
 **$\mu$**  = Efecto de la media general.  
 **$T_i$**  = Efecto del i-esimo nivel de concentración de MS.  
 **$B_j$**  = Efecto del j-esima repetición.  
 **$E_{ij}$**  = Error experimental asociado a la ij-esima unidad experimental.

La distribución de las unidades experimentales en el cuarto de crecimiento del laboratorio quedó como se esquematiza en la Figura 12.



**Figura 12.** Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala por medio de primordios foliares.

**D. Variables de respuesta**

- a. **Número de esporofitos jóvenes por unidad experimental.**
- b. **Altura promedio (cm) de esporofito joven.**

**E. Manejo del experimento**

Para realizar la propagación de calahuala a partir de primordios foliares se siguió la siguiente metodología:

**a. Preparación de los medios de cultivo y llenado de los frascos**

El medio de cultivo Wetmore (1954) se preparó tomando las cantidades alícuotas de cada componente indicadas en el Cuadro 9, y colocándolas dentro de un beakers con 1000 mL de agua destilada el cual se colocó sobre una agitadora mecánica para obtener una mezcla uniforme. Luego de haber mezclado todos los componentes del medio de cultivo se procedió a agregar un suplemento de sacarosa (20 mg/L) y 1 g de agar como agente solidificante.

Luego se agregó a cada 10 frascos la dosis de ANA y BAP que se indica en el Cuadro 8 de descripción de los tratamientos a fin de obtener los 7 tratamientos con 10 repeticiones cada uno.

**b. Obtención y desinfección de los primordios foliares de las plantas donantes**

Los primordios foliares se colectaron entre 7:00 y 8:00 a.m. de las plantas donantes de calahuala ubicadas en el umbráculo. Se extrajeron los rizomas que presentaron la mayor cantidad de primordios foliares y se trataron con una solución antifúngica compuesta por: 0.10 % de funbac, 0.15 % de benomyl, 0.40 % de ácido nítrico y 0.20 % de ácido ascórbico.

Para evitar la oxidación que se produce después de 24 horas de cortados los ápices de brote se trabajaron inmediatamente (siete horas después 3:00 p.m.). Al laboratorio de cultivo de tejidos de la FAUSAC se trasladaron los rizomas con los primordios foliares y en la cámara de flujo laminar se les quitó el exceso de la solución antifúngica por medio de un lavado durante 5 minutos con hipoclorito de sodio al 2 por ciento, luego se lavarán tres veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio.

Dentro de la cámara de flujo laminar se disectaron los explantes de primordios foliares, para lo cual se emplearon pinzas y bisturí obteniendo un total de 70 primordios foliares de 5 mm de ancho por 6 mm de largo y se colocaron inicialmente en cajas de petri.

**c. Siembra de los primordios foliares en los frascos**

Una vez todos los primordios foliares estaban libres de vellosidades se procedió a inocularlos en cada uno de los 70 frascos.

**d. Incubación de los medios de cultivo**

Las condiciones de incubación de los medios de cultivo con los primordios foliares fueron las mismas que se indican para la incubación de ápices de brote.

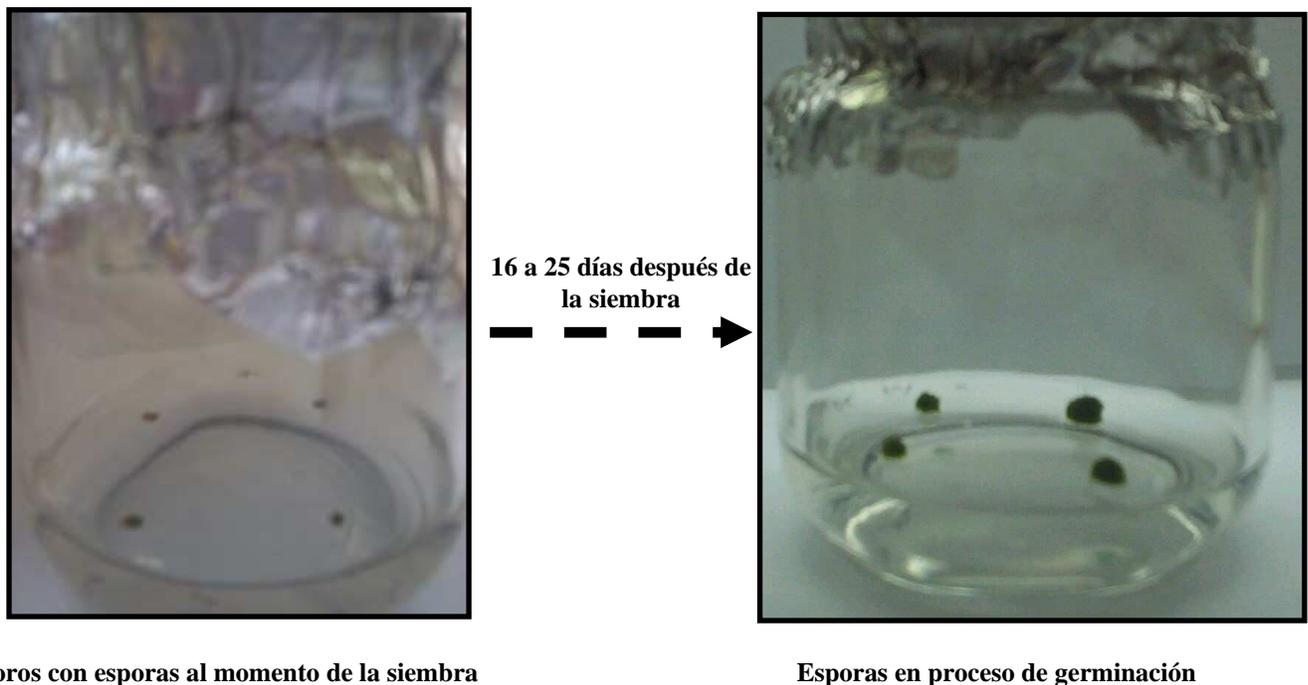
**F. Toma y registro de datos**

Como no se obtuvo respuesta a la propagación *in vitro* de calahuala en el medio de cultivo Wetmore no hubo datos que registrar ni analizar estadísticamente

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

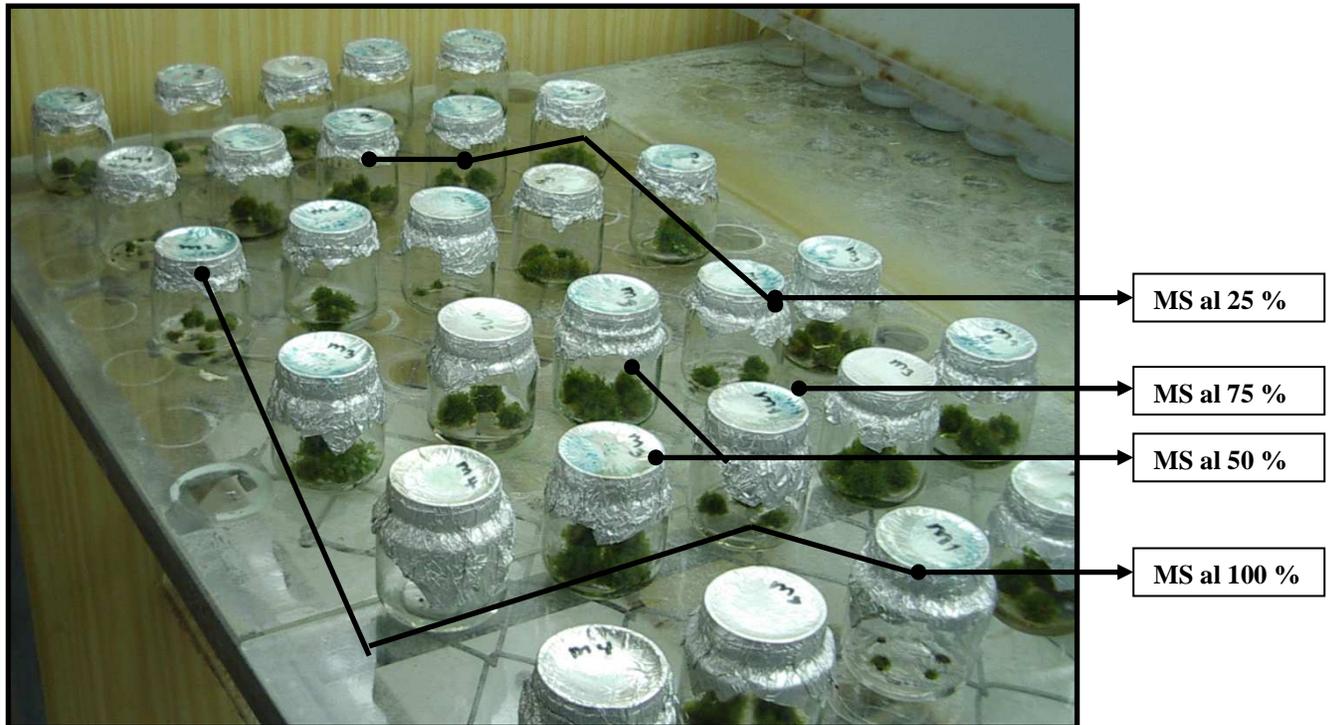
### 7.1 PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ESPORAS

Se obtuvo respuesta positiva a la propagación *in vitro* de calahuala por medio de esporas en cada una de las cuatro concentraciones del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (100, 75, 50 y 25 por ciento de sales). La germinación de las esporas se inició entre los 16 a 25 días después de la siembra, mostrando un protalo verde oscuro tal como se muestra en la Figura 13; a los 90 días después de la siembra se realizó el licuado de protalos, los cuales para esta fecha tenían la apariencia que se muestra en la Figura 14; a los 120 días después del licuado de los protalos se procedió a la toma de datos de las variables de respuesta: número de esporofitos por unidad experimental y altura promedio de esporofitos en centímetros. La duración total del experimento para obtener esporofitos jóvenes de calahuala por medio de esporas fue de siete meses a partir de la siembra, lo cual equivale a 210 días.



**Figura 13.** Esporas de calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger germinadas entre los 16 a 25 días después de la siembra.

Como se observa en la Figura 13, los soros liberaron las esporas y éstas iniciaron el proceso de germinación para formar el protalo.



**Figura 14. Masa de protalos a los 90 días después de la siembra de las esporas y previo al licuado de los mismos.**

En la figura de arriba se puede apreciar que previo al licuado de los protalos a los 90 días después de la siembra de los soros, la masa de protalo fue mayor en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50 %, luego se encuentran con similar masa de protalo el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 25 y 75 % y la menor masa de protalo se presentó en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 100 por ciento; en tal sentido sería de esperarse durante el licuado de los mismos mayor posibilidad de unión de anteridios (productor de esperma) para fecundar los arquegonios (óvulos) y por lo tanto mayor cantidad de esporofitos jóvenes de acuerdo a la cantidad de masa protolar formada.

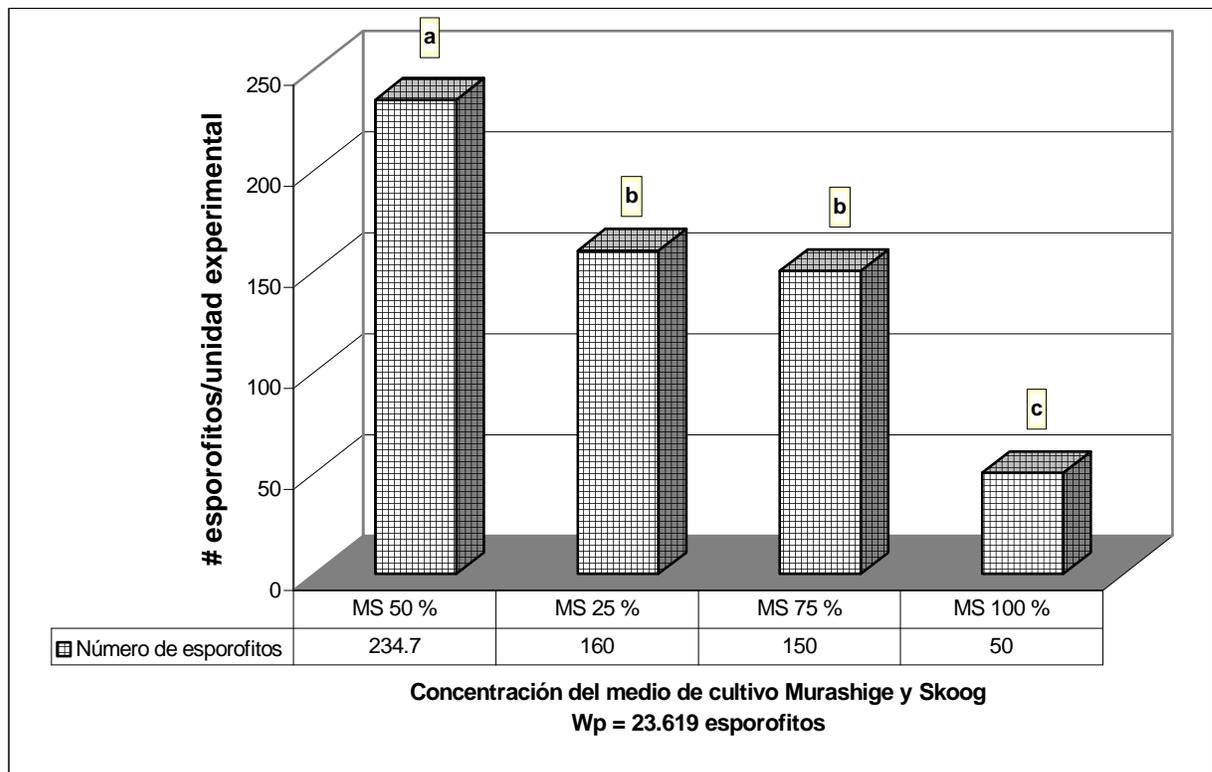
### **7.1.1 NÚMERO DE ESPOROFITOS POR UNIDAD EXPERIMENTAL**

Los valores correspondientes a las 40 observaciones del número de esporofitos presentan una distribución normal con una W Normal de 0.949 y una  $Pr < W$  de 0.103, la cual es mayor a 0.05 (Anexo 1). En el Cuadro 7, se presenta el resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta número de esporofitos jóvenes por unidad experimental a los 210 días después de la siembra de los soros.

**Cuadro 7. Resumen del ANDEVA para el número de esporofitos por unidad experimental.**

| F.V.               | G.L. | S.C.               | C.M.    | Fc          | Ft <sub>05</sub> | Signi |
|--------------------|------|--------------------|---------|-------------|------------------|-------|
| <b>Tratamiento</b> | 3    | 172670.675         | 57556.9 | 149.6701194 | 2.87             | *     |
| <b>Error</b>       | 36   | 13844.100          | 384.558 |             |                  |       |
| <b>Total</b>       | 39   | 186514.775         |         |             |                  |       |
| <b>C.V. %=</b>     |      | <b>13.18995052</b> |         |             |                  |       |

Del Cuadro 7, se aprecia que la F calculada (149.67) es mayor que la F tabulada (2.87), por lo tanto existe significancia al cinco por ciento entre los tratamientos, es decir que al menos un tratamiento presenta un cantidad de esporofitos por unidad experimental diferente al de los demás. Para establecer cual o cuales tratamientos presentaron el mayor número de esporofitos por unidad experimental se procedió a realizar la prueba múltiple de medias de Tukey al cinco por ciento de significancia cuyo resumen se presenta en la Figura 15.

**Figura 15. Resumen de la prueba de medias de Tukey para el número de esporofitos por unidad experimental.**

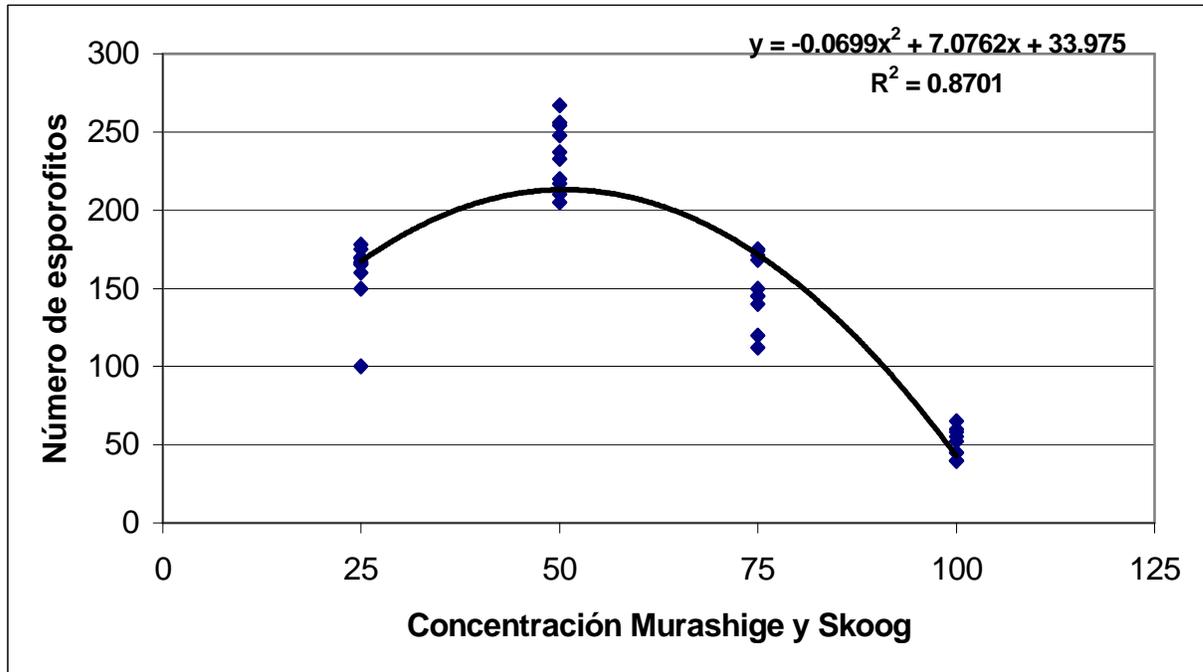
Estadísticamente y con una confianza del 95% en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50 % de concentración se obtuvo el mayor número de esporofitos (234.7 esporofitos) por unidad experimental,

el segundo lugar se obtuvo en el mismo medio de cultivo a concentraciones del 25 y 75 % con 160 y 150 esporofitos por unidad experimental respectivamente; al emplear el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 100 % de concentración se obtuvo la más baja cantidad de esporofitos de calahuala por unidad experimental siendo ésta de 50.

Al aumentar la concentración del medio de cultivo por arriba del 50 por ciento, el número de esporofitos por unidad experimental se disminuye y al reducir la concentración del medio de cultivo a menos del 50 por ciento también el número de esporofitos por unidad experimental disminuye como se muestra en la Figura 16. En otras palabras la concentración ideal del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) para la propagación *in vitro* de calahuala es aquella que tiene la mitad de macro y micronutrientes, así como los demás componentes del medio de cultivo; en otros helechos como *Polypodium aureum* *Pteris cretica* y *Thelypteris dentata* los medios de cultivo para la propagación de esporas con concentraciones reducidas a la mitad de macro y micronutrientes también han presentado buenos resultados en comparación con los medios con concentraciones altas y muy bajas de macro y micronutrientes (10, 20, 25).

Puesto que a concentraciones altas y bajas del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) el número de esporofitos jóvenes disminuye, sugiere que puede existir una relación cuadrática entre la concentración de sales del medio de cultivo y el número de esporofitos, por lo que se realizó dicho análisis de regresión, siendo la variable dependiente el número de esporofitos. Se obtuvo significancia para el modelo de regresión ( $\text{Prob} > F = 0.0001$ ) con una F calculada de 123.92 y 37 grados de libertad del error (Anexo 1).

El modelo matemático que explica la relación, así como la distribución de los datos se presenta en la Figura 16.



**Figura 16. Resumen del análisis de regresión: concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) sobre el número de esporofitos por unidad experimental.**

El modelo matemático traducido a las variables analizadas queda como:

$$NE = -0.0699 ([MS])^2 + 7.0762 ([MS]) + 33.975$$

**Donde:**

NE = Número de esporofitos por unidad experimental.

[MS] = Concentración del medio de cultivo en porcentaje.

Explicar un modelo cuadrático es más difícil que explicar un modelo lineal, puesto que en éste último se tiene una sola pendiente que indica el incremento en Y por cada unidad o múltiplo de unidades que se adicione en X; en tal sentido se le asignarán valores al modelo idealizado cuadrático para explicar el incremento a través de un único valor como en un modelo lineal (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Incremento o pendiente del modelo cuadrático de regresión: concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) versus el número de esporofitos.**

| [MS] | NE = $-0.0699 ([MS])^2 + 7.0762 ([MS]) + 33.975$ | Incremento Relativo | Incremento Neto |
|------|--|---------------------|-----------------|
| 0    | 33.975   |                     |                 |
| 25   | 167.1925   | 133.2175            |                 |
| 50   | 213.035  | 45.8425             | -87.375         |
| 75   | 171.5025   | -41.5325            | -87.375         |
| 100  | 42.595   | -128.9075           | -87.375         |

En la segunda columna del Cuadro 8, se presenta el número de esporofitos que se obtendrían bajo el modelo idealizado cuadrático para cada una de las cuatro concentraciones del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962); la tercera columna muestra el incremento/decremento que se da en el número de esporofitos entre cada concentración del medio de cultivo y la cuarta columna muestra el incremento neto que se obtiene de restar los incrementos relativos.

Como se aprecia en el Cuadro 8, por cada 25 por ciento que se incremente la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), se tendrá una reducción neta de 87.375 esporofitos por unidad experimental; de la misma forma por cada unidad porcentual en que se incremente la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), el número de esporofitos se reducirá en 3.495 esporofitos por unidad experimental.

### 7.1.2 ALTURA PROMEDIO DE ESPOROFITOS

Los datos de las alturas promedio de los esporofitos de calahuala en centímetros presentan una distribución normal puesto que el  $W$  normal = 0.964 con una  $Pr < W = 0.329$ , la cual es mayor a 0.05 (Anexo 1). El resumen del análisis de varianza se presenta en el Cuadro 9.

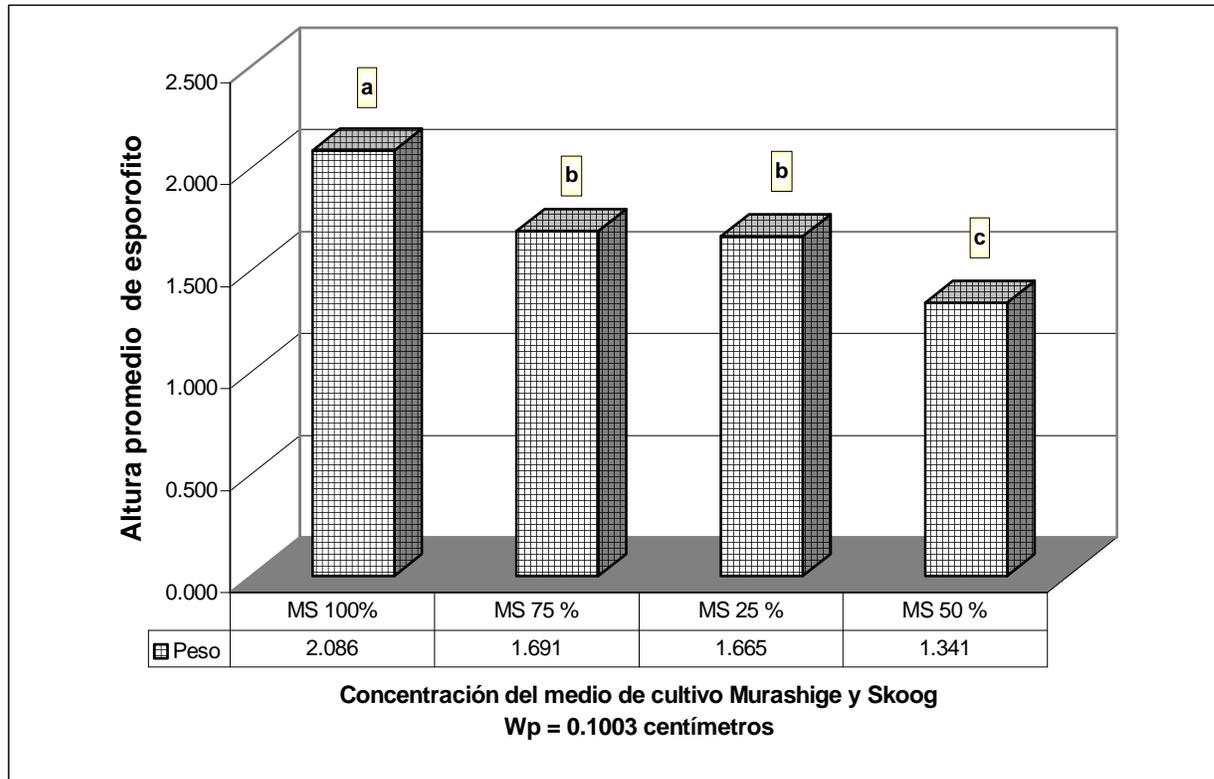
**Cuadro 9. Resumen del ANDEVA para la altura promedio de esporofitos.**

| F.V.        | G.L. | S.C.      | C.M.    | Fc          | Ft <sub>05</sub> | Signi |
|-------------|------|-----------|---------|-------------|------------------|-------|
| Tratamiento | 3    | 2.7911075 | 0.93037 | 134.2577865 | 2.87             | *     |
| Error       | 36   | 0.249     | 0.00693 |             |                  |       |
| Total       | 39   | 3.041     |         |             |                  |       |

|          |             |
|----------|-------------|
| C.V. % = | 4.909034535 |
|----------|-------------|

Para la variable de respuesta altura promedio de esporofitos, el resumen del ANDEVA indica que al menos uno de los cuatro tratamientos presenta una altura de esporofito distinta a los demás puesto que la  $F$

calculada (134.25) es mayor que la F de tabla (2.87); en tal sentido se realizó la prueba múltiple de medias de Tukey cuyo resumen se presenta en la Figura 17.



**Figura 17. Resumen de la prueba de medias de Tukey para la altura promedio de esporofitos en centímetros.**

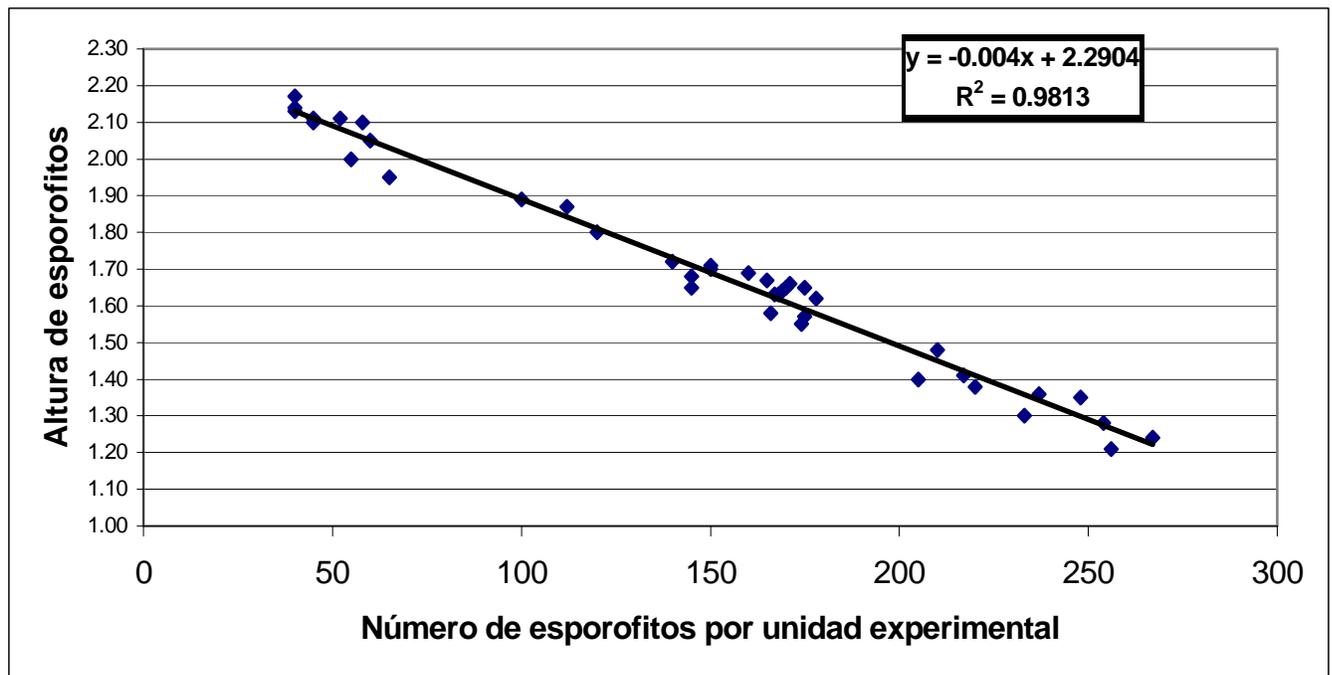
Como se aprecia en la Figura 17, la mayor altura de esporofitos jóvenes de calahuala se obtuvo en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 100 % de concentración (2.086 centímetros), siendo estadísticamente distinta a las otras alturas obtenidas en el mismo medio de cultivo pero reducidas en su concentración. El segundo lugar en altura de esporofito joven se obtuvo en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 75 y 25 % de concentración con 1.691 y 1.665 centímetros respectivamente; el último lugar se obtuvo en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) reducido al 50 % con esporofitos de 1.341 centímetros de altura.

Al contrastar la altura de los esporofitos en cada concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (Figura 17) con el número de esporofitos por unidad experimental (Figura 15), se aprecia que la altura presenta una relación inversa, es decir que a mayor cantidad de esporofitos por unidad experimental

menor altura presentan, lo cual se debe a la competencia entre ellos por nutrientes en el medio de cultivo, oxígeno, luz y espacio en general.

Para corroborar lo expresado en el párrafo anterior se corrió un análisis de regresión donde la variable dependiente fue la altura promedio de los esporofitos y la variable independiente el número de esporofitos por unidad experimental, considerando en el análisis los datos de cada una de las 10 repeticiones, es decir 40 parejas de datos “X” y “Y”. En el análisis de varianza se obtuvo significancia para el modelo de regresión ( $\text{Prob} > F = 0.0001$ ) con una F calculada de 1,997.197 y 37 grados de libertad del error (Anexo 1).

El modelo matemático que explica la relación, así como la distribución de los datos se presenta en la Figura 18.



**Figura 18. Resumen del análisis de regresión: Número de esporofitos jóvenes de calahuala por unidad experimental versus altura de esporofitos en centímetros.**

El modelo matemático traducido a las variables analizadas queda como:

$$AE = - 0.004 (NE) + 2.2904$$

**Donde:**

AE = Altura de esporofitos jóvenes de calahuala en centímetros.

(NE) = Número de esporofitos jóvenes de calahuala por unidad experimental.

El modelo de regresión indica que por cada esporofito joven de calahuala adicional presente en la unidad experimental, la altura del conjunto de esporofitos se reducirá en 0.004 centímetros, lo que equivale a decir que por cada 50 esporofitos jóvenes adicionales en la unidad experimental, la altura del conjunto de esporofitos se reducirá en 0.2 centímetros o sea 2 milímetros, lo cual no se debe a la reducción porcentual de la concentración del medio de cultivo sino a la cantidad de esporofitos por la competencia entre ellos por nutrientes, luz y espacio como se indicó anteriormente.

Considerando el análisis de regresión que presenta una relación inversa entre la altura de los esporofitos y el número de esporofitos por unidad experimental, es recomendable que al momento de propagar comercialmente la calahuala a partir de soros se hagan subcultivos de acuerdo a la cantidad de protalo presente después del licuado.

En la Figura 20, se presentan distintas vistas de los esporofitos jóvenes de calahuala micropropagada a partir de soros en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

### 7.1.3 REPRODUCCIÓN NATURAL VERSUS REPRODUCCIÓN *IN VITRO*

En condiciones naturales, como en el caso de la aldea La Ciénaga, San José Pinula, Guatemala, se observó en el bosque, creciendo plantas adultas, de las cuales normalmente los esporofitos jóvenes provenían de rizomas rastreros incrustados en troncos de pino, representando menos del uno por ciento de las plantas adultas. Considerando que a nivel *in vitro* de 4 soros (conjunto de esporangios que contienen esporas) se obtuvo 237 esporofitos jóvenes en promedio, de un solo fronde en el campo que contiene en promedio 1000 soros, se estarían micropropagando 59,250 esporofitos jóvenes; sin embargo, en el campo se evidenció de un total de 67 frondes únicamente 4 esporofitos jóvenes provenientes de esporas (Figura 19).



**Figura 19.** Esporofitos jóvenes propagados naturalmente a partir de esporas en aldea La Ciénaga, San José Pinula, Guatemala, 2004.



**Figura 20. Esporofitos jóvenes de calahuala obtenidos a partir de esporas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).**

En la Figura 20, en (a) se muestran los esporofitos dentro de los frascos de 125 mililitros de capacidad, en (c) cuando se extrajeron de los frascos y se disectaron para su conteo y en (b) se están midiendo cada uno de los esporofitos jóvenes de calahuala.

## 7.2 PROPAGACIÓN DE CALAHUALA POR MEDIO DE ÁPICES DE BROTE Y PRIMORDIOS FOLIARES

Al propagar *in vitro* ápices de brote de calahuala en el medio de cultivo Murashige sin la auxina ANA y la citoquinina BAP y combinaciones de 0.1 y 0.5 de ANA con 0.05, 0.50 y 1.00 de BAP, así como al propagar *in vitro* primordios foliares de calahuala en el medio de cultivo Wetmore sin la auxina ANA y la citoquinina BAP y combinaciones de 0.1 y 0.5 de ANA con 0.05, 0.50 y 1.00 de BAP, no se obtuvo en ninguna de las repeticiones respuesta positiva a la micropropagación, porque los dos tipos de explantes se oxidaron antes de formar callo, a pesar de que se les aplicó ácido cítrico y ácido ascórbico para evitar la oxidación, así como también se protegieron los explantes contra bacterias por medio de antibióticos y contra los hongos por medio de fungicidas.

Es muy probable que los medios de cultivo para cada tipo de explante no sean los apropiados o que haya que emplear otras concentraciones de reguladores del crecimiento para la diferenciación celular y formación de callo.

Sin embargo, considerando a la calahuala como especie a micropropagar, se obtuvo respuesta positiva por medio de esporas, por lo cual no es necesario seguir investigando en otros medios de cultivo para propagarla por medio de ápices de brote y primordios foliares, ya que este recurso se emplea en otros helechos cuando las esporas no son viables o el helecho en sí no produce estructuras sexuales de propagación tal como lo indica Hoshizaki (13).

## 8. CONCLUSIONES

- 8.1 De los tres explantes utilizados para la propagación *in vitro* de calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) **Lellinger**, únicamente fue posible micropropagarla a través de esporas en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). No se pudo propagar a través de ápices de brote en el medio de cultivo Murashige (1974), como tampoco a través de primordios foliares en el medio de cultivo Wetmore.
- 8.2 Al micropropagar la calahuala por medio de esporas, se obtiene el mayor número de esporofitos por unidad experimental en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales reducidas al 50 por ciento con 234.7 esporofitos jóvenes por unidad experimental y una altura promedio por esporofito de 1.341 centímetros.
- 8.3 Cuando en el frasco de 125 ml de capacidad la cantidad de esporofitos es alta (237) la altura de los esporofitos se reduce por la competencia de estos por luz, espacio y nutrientes, por lo que es conveniente que en cada frasco se tengan no mas de 75 esporofitos jóvenes para lo cual es necesario hacer subcultivos.

## 9. RECOMENDACIONES

- 9.1 Para la propagación masiva *in vitro* de calahuala se recomienda emplear el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 50 % de su concentración original, ya que en este medio se obtienen a los 210 días después de la siembra, 234.7 esporofitos jóvenes por unidad experimental con una altura de 1.341 centímetros.
- 9.2 Se recomienda que en cada frasco de 125 ml de capacidad no se tengan más de 75 esporofitos jóvenes debido a que se limita su desarrollo por competencia de espacio, luz y nutrientes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. ALTERTEC (Tecnología Alternativa, GT). 1993. Cultivo y aprovechamiento y uso de las plantas medicinales. Guatemala. p. 3, 11.
2. Amador, D. 1999. Reguladores del crecimiento utilizados en cultivo de tejidos vegetales: términos y conceptos fundamentales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 12 p.
3. Andrade Castañeda, JC. 2003. Búsqueda de sustratos opcionales para la producción bajo cultivo de calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 56 p.
4. Burr, RW. 1975. Mass propagation of Boston fern through tissue culture. Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc. 25:122-124.
5. Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala, Editorial Universitaria. p. 105-107.
6. Campezo, SN. 1999. 1000 plantas medicinales, aromáticas y culinarias. España, Servilibro. p. 5.
7. CONAP (Consejo Nacional de Areas Protegidas, GT). 2001. Listado de especies de flora silvestre amenazadas de extinción (lista roja de flora). Guatemala, Secretaria Ejecutiva Departamento de Vida Silvestre. p. 23,50.
8. Cronquist, A. 1987. Introducción a la botánica. México, Continental. p. 360.
9. Dorling Kindersley, US. 1983. Un jardín dentro de casa. México, Reader's Digest. p. 325-326.
10. Freeberg, JA; Wetmore, RH. 1957. Gametophytes of *Lycopodium* as grow *in vitro*. Phytomorph. 7:204-217.
11. George, EF; Sherrington, PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. England, Exegetics. 709 p.
12. Hennen, GR; Sheenan, TJ. 1978. *In vitro* propagation of platycerium stemaria. HortScience 13(3):245.
13. Hoshizaki, BJ. 1979. Fern growers manual. New York, US, Timber Press. p. 63-73.
14. Knudson, L. 1943. Nutrient solutions for orchid seed germination. Am. Orchid Soc. Bull. 12:77-79.
15. Litz, RE; Jarret, RL. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos; embriogénesis somática y organogénesis. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca, Luis Mroginski. Colombia, CIAT. p. 143-172.
16. Loescher, WH; Albrecht, CN. 1978. Development *in vitro* of *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis runner tissues. Physiol. Plant. 47:250-254.
17. Martinez, JV; Bernal, HY; Cáceres, A. 2000. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales. Santa Fé de Bogotá, Colombia, Iberoamericana CAB-CYTED. p. 350-356.

18. Méndez, G. 2000. URL leather leaf: hoja de cuero, *Rumora adiantiformis*. Guatemala. Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Agrícolas y Ambientales. 10 p.
19. Miller and Miller, PM. 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.
20. Miller, JH. 1968. Fern gametophytes as experimental material. *Bot. Rev.* 34:361-426.
21. Moore, GT. 1903. Methods for growing pure cultures in algae. *J. Appl. Micros. Lab. Meth.* 6:2309-2314.
22. Mroginsk, LA; Roca, WM. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. *In Cultivo de tejidos en agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Ed. por William Roca; Luis Mroginski. Colombia, CIAT. p. 19-40.
23. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
24. Murashige, T; Skoog, F. 1962. A reviser medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
25. Nasson, A. 1989. *Biología*. Trad. Juan Luis Cifuentes. México, Limusa. p. 349-351.
26. Steeves, TA; Sussex, TA. 1957. Studies on the development of excised leaves in sterile culture. *Am. J. Bot.* 44:665-673.
27. Stolze, RG. 1981. Ferns and fern allies of Guatemala. New York, US, Fieldiana Botany. v. 39, pte. 2, 522 p.
28. Villalobos A, VM. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetal. Roma. Italia, FAO. p. 3-41. (Cuadernillo 105).
29. Villancinda Maldonado, RW. 1990. Respuesta de la especie tres puntas *Neuroloma lobata* L.) a la propagación *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 93.
30. Weaber, RJ. 1987. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.
31. Wetmore, RH. 1954. The use of *in vitro* cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants. *Brookhaven Symp. Biol.* 6:22-38.
32. White, PR. 1954. The cultivation on animal and plant cells. 15 ed. New York, US, Ronald Press. 19-25 p.

## 11. ANEXOS

### **ANEXO 1: DATOS DE LABORATORIO PARA LA ENTRADA DE SAS Y SALIDA DE SAS CON LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

| TRATAMIENTOS         | REPETICIONES |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |
|----------------------|--------------|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
|                      | R1           |      | R2  |      | R3  |      | R4  |      | R5  |      | R6  |      | R7  |      | R8  |      | R9  |      | R10 |      |
|                      | NE           | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  | NE  | Alt  |
| <b>T1 (MS 100 %)</b> | 40           | 2.14 | 45  | 2.10 | 60  | 2.05 | 55  | 2.00 | 58  | 2.10 | 40  | 2.17 | 52  | 2.11 | 65  | 1.95 | 45  | 2.11 | 40  | 2.13 |
| <b>T2 (MS 75 %)</b>  | 120          | 1.80 | 150 | 1.70 | 140 | 1.72 | 145 | 1.68 | 175 | 1.65 | 112 | 1.87 | 174 | 1.55 | 168 | 1.63 | 171 | 1.66 | 145 | 1.65 |
| <b>T3 (MS 50 %)</b>  | 205          | 1.40 | 217 | 1.41 | 248 | 1.35 | 233 | 1.30 | 267 | 1.24 | 254 | 1.28 | 220 | 1.38 | 237 | 1.36 | 210 | 1.48 | 256 | 1.21 |
| <b>T4 (MS 25 %)</b>  | 150          | 1.71 | 167 | 1.63 | 175 | 1.57 | 100 | 1.89 | 160 | 1.69 | 178 | 1.62 | 166 | 1.58 | 170 | 1.65 | 169 | 1.64 | 165 | 1.67 |

**Referencias:** NE = número de esporofitos jóvenes por unidad experimental; Alt = altura promedio de esporofitos jóvenes por unidad experimental.