

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**



**EFFECTO DE LAS VITAMINAS EN EL DESARROLLO**  
*in vitro* DE *Nephrolepis exaltata*

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA**

**PRESENTA**  
**YOLANDA ALEJANDRE CASTILLO**

**N, N. L.**

**DICIEMBRE 1996**

120

FA2  
1996  
C.5

T  
SB100  
A4  
c.1

FA2  
1996  
C.5



1080072020

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**



**EFFECTO DE LAS VITAMINAS EN EL DESARROLLO**

*in vitro* DE *Nephrolepis exaltata*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA**

**PRESENTA**

***YOLANDA ALEJANDRE CASTILLO***

**MARIN, N. L.**

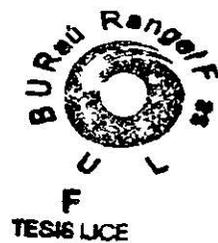
**DICIEMBRE 1996**

**12638**

T  
SB120

A4

040.635  
FA2  
1996  
C-5



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE AGRONOMIA

“T E S I S”

EFFECTO DE LAS VITAMINAS EN EL DESARROLLO  
*in vitro* DE *Nephrolepis exaltata*

ELABORADA POR:

*YOLANDA ALEJANDRE CASTILLO*

ACEPTADA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

COMITE SUPERVISOR DE TESIS



---

DRA. ELIZABETH CARDENAS CERDA  
Asesor Principal



---

DRA. AURORA GARZA ZUÑIGA

Asesor



---

LIC. MA. DE LA LUZ GONZALEZ LOPEZ

Asesor

## ***DEDICATORIAS***

***A Dios***

A la memoria de mi madre:

***SRA. DOLORES CASTILLO DE ALEJANDRE***

A mi padre:

***SR. FRANCISCO ALEJANDRE RIVERA***

Gracias por darme la oportunidad de estudiar esta carrera y por seguir apoyándome.

A mis hermanos:

***Rosy  
Francisco  
July  
Lolis  
Mario  
Carlos***

*Por todo el apoyo que siempre me han brindado y especialmente a July por estar siempre pendiente de mí. Gracias July.*

*A mis sobrinos: Carol, Omar, Walter, Selene, Bere, Brenda, Ma. Fernanda, William y al que viene, los quiero mucho.*

*A mis tíos: Sr. Azahel Alejandro Rivera† y Sra. Apolinar Gómez de Alejandro.  
Sr. Rubén Alejandro Rivera y Sra. Emma Salas de Alejandro.  
Por brindarme su apoyo durante mi estancia en esta ciudad.  
Gracias tíos.*

*A mi prima Ing. Dora Luz Alejandro Rosas; por brindarme su apoyo para seguir adelante con mis estudios y por aguantarme todos estos años. Gracias Doris.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Especialmente a la Dra. Elizabeth Cárdenas Cerda por su asesoría y colaboración en la realización de este experimento.*

*A la Dra. Aurora Garza Zúñiga por su colaboración en la revisión del presente trabajo y por brindarme su amistad.*

*A la Lic. Ma. de la Luz González López por la ayuda brindada en la interpretación de los resultados en el presente trabajo.*

*A la Srita. Elisa Ramírez García por su apoyo incondicional en el escrito e impresión del presente trabajo. Gracias por tu amistad. ("Margarita").*

*A los entrenadores, Francisco Reyes y Magda Ramírez por su apoyo y ayuda durante toda mi carrera profesional.*

*Al Ing. Manuel Siller, Connie, Yola Díaz, Lidia y Lety por su apoyo y amistad.*

*A Don Arturo, Doña Tere y a Malena por ayudarme todos estos años, gracias.*

*A todas mis compañeras y amigas del soft boll.*

*A mis amigos Pedro y Gilberto por enseñarme a valorar las cosas positivas de la vida.*

*A todas aquellas personas que de alguna u otra manera me ayudaron a culminar mis estudios.*

***A ti..... ¡Muchas Gracias!***

# INDICE

	Página
Indice de Cuadros y Figuras -----	I
I.- Introducción-----	1
II.- Revisión de Literatura -----	3
2.1. Importancia económica de los helechos -----	3
2.2. Clasificación de la especie -----	4
2.3. Descripción de la especie -----	4
2.4. Concepto de micropropagación -----	5
2.4.1. Importancia de la micropropagación-----	5
2.4.2. Etapas de la micropropagación -----	6
2.5. Constituyentes de los medios de cultivo-----	9
2.6. Vitaminas-----	13
2.6.1. Clasificación de las vitaminas -----	13
2.6.2. Ac. nicotínico-----	13
2.6.3. Piridoxina -----	14
2.6.4. Tiamina-----	14
2.6.5. Vitaminas en cultivo de tejidos vegetales -----	15
2.7. Micropropagación de helechos-----	16
III.- Materiales y Métodos-----	18
3.1. Localización -----	18
3.2. Materiales de laboratorio-----	18

3.2.1.	Equipo e instrumental -----	18
3.2.2.	Material de cristalería -----	18
3.2.3.	Compuestos químicos -----	19
3.2.4.	Material de laboratorio diverso -----	20
3.3.	Establecimiento <u>in vitro</u> -----	20
3.3.1.	Selección de la planta madre -----	20
3.3.2.	Obtención del explante -----	21
3.3.3.	Desinfección del explante -----	21
3.3.4.	Siembra del explante -----	21
3.4.	Fase de proliferación -----	24
IV.-	Resultados y Discusión -----	27
V.-	Conclusiones -----	36
VI.-	Bibliografía -----	37

# INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
1.- Análisis de varianza para la variable número de propágulos por repetición ---	27
2.- Comparación de medias del número de propágulos por repetición-----	28
3.- Análisis de varianza para el número de propágulos con brote -----	29
4.- Comparación de medias para la variable número de propágulos con brote ----	31

## **Figuras**

1.- Resultados de los tratamientos para la variable número de propágulos-----	30
2.- Resultados de los tratamientos del número de propágulos con brotes -----	32
3.- Número de propágulos sin brotes -----	34
4.- Comportamiento de los tratamientos al obtener los propágulos de 1 a 5 brotes -----	35

## 1.-INTRODUCCION

Desde la aparición de las primeras civilizaciones, las plantas han jugado un papel preponderante en la vida del hombre. Los usos a los que las plantas se destinaban en la antigüedad han sido determinados a través del análisis de escritos y murales encontrados en excavaciones; es así como se descubrió que el hombre diseñó los primeros jardines entre los siglos XVIII y XIV a.C. (Browne, 1980).

En la actualidad la arquitectura del paisaje y diseño de jardines cada vez toma mayor auge ya que al destruirse las áreas verdes nativas para la construcción de empresas, industrias, casas habitación, etc. se recurre a la construcción de jardines para compensar las áreas verdes destruidas.

Cuando un jardín se crea, las plantas decorativas constituyen el principal elemento estructural en su diseño y son la fuente primaria de decoración y color.

Una de las plantas de gran relevancia de uso decorativo de media sombra que se utiliza en el diseño de jardines tanto de interior como exterior, es el helecho Boston (*Nephrolepis exaltata*) ya que la belleza de sus frondas proporciona un ambiente de elegancia al lugar.

El helecho Boston es una planta híbrida que no produce esporas viables, pero que es de una fácil adaptación a propagarse vegetativamente, ya sea por el método tradicional, o bien por medio de micropropagación. Esta última técnica, además que ha demostrado ser eficiente para la propagación de helechos en gran escala, también puede ser utilizada como

una herramienta experimental para el estudio de la actividad que presentan ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos con los que se adicionan al medio de cultivo. Por lo anterior el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de las vitaminas simples o combinadas en el desarrollo in-vitro de *Nephrolepis exaltata* en la fase de proliferación.

## **2.- REVISION DE LITERATURA**

### **2.1. Importancia Económica de los Helechos**

En la época victoriana los helechos gozaron de un grado de popularidad sin igual en la historia de la jardinería. Sus diversas formas y diferentes tonos verdes, su adaptabilidad a locales fríos y a la escasez de iluminación interior, junto a su capacidad de crecer en el exterior en lugares húmedos y en sombra, donde pocas plantas parecían capaces de prosperar, fueron factores que les granjearon miles de simpatías. A finales del siglo XIX se escribieron más libros sobre helechos que cualquier otro tipo de planta. Tras un período de “olvido”, los helechos recuperan ahora de nuevo su popularidad. Los floricultores han apreciado en seguida la belleza de sus frondas y los jardineros se están dando cuenta del espléndido contraste que forman frente a los vivos colores de las flores vecinas. (Wright 1978).

Los helechos se utilizan principalmente en el diseño de jardines, áreas verdes, balcones, terrazas, etc.; también para dar fondo y complemento a los arreglos florales (FIRA, 1985) y como complemento decorativo de navidad (Cronquist, 1977).

Además el helecho Boston es una de las plantas de follaje que se producen por cultivo de tejidos y que se puede exportar a Estados Unidos a raíz desnuda debido a su fácil manejo y sin restricciones fitosanitarias.

## 2.2. Clasificación de la Especie.

División	-	Pteridophyta
Orden	-	Filicales
Familia	-	Polypodiaceae
Género	-	Nephrolepis
Especie	-	exaltata

El nombre genérico científico deriva del griego “Nephros”, riñón y “lepis” escama, hace referencia a la escama reniforme del indusio, es decir, la membrana que cubre los órganos reproductores. (Bailey, 1977).

## 2.3. Descripción de la Especie.

*Nephrolepis* es originario de las zonas tropicales de América, Africa y Australia (Bailey, 1977).

Planta carente de tronco con grandes frondas pennados o bipennados, de larga duración y curvados de un modo muy elegante aunque desnudos en un breve trecho por la base. *Nephrolepis* emite una serie de estolones de los que pueden desarrollarse nuevas plántulas (Bailey, 1977).

La forma tradicional de propagar el helecho Boston es vegetativamente, subdividiendo la planta madre; se efectúa al terminar el invierno, antes de que se produzca la emisión de hojas; se realiza con cuidado, dividiendo la planta madre en 2-3 partes. (Browne, 1980).

## **2.4.- Concepto de Micropropagación.**

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se pueda controlar estrictamente las condiciones de ambiente y la nutrición.( Hartmann and Kester 1987).

Originalmente, la micropropagación se definió como "cualquier" procedimiento aséptico que comprende la manipulación en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. (Krikorian 1991).

Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva in-vitro. (Villalobos y Thorpe 1991).

### **2.4.1. Importancia de la micropropagación.**

En la actualidad, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y, más recientemente, en especies leñosas (Murashige, Hughes y Thorpe citados por Villalobos y Thorpe, 1991). En algunas especies, esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación, las más importantes son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in-vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos. (Villalobos y Thorpe, 1991).

#### **2.4.2. Etapas de la Micropropagación.**

Existen cuatro etapas fundamentales para micropropagar eficientemente una especie.

##### **Etapas de la Micropropagación**

#### **Etapas de la Micropropagación**

El objetivo de la etapa I es simplemente obtener un cultivo de tejidos aséptico de la planta en cuestión, Murashige (1974), Hartmann y Kester (1987).

El objetivo de esta etapa es obtener un gran porcentaje de explantes libres de contaminantes; esto se logra sometiendo al tejido a un lavado con agua corriente, seguido por la esterilización con uno o más desinfectantes a concentraciones apropiadas y en tiempos determinados según la especie (Torres, 1988).

Una vez que se logró el establecimiento aséptico y existan evidencias como el alargamiento de los brotes apicales, presencia de yemas adventicias, embriones adventicios

aparentes o callos desarrollados, entonces se habrá cumplido con el objetivo de la etapa I (Murashige, 1974; Hartmann y Kester, 1987).

En esta etapa, tal vez la selección del explante es el más crítico ya que debe ser fisiológicamente competente para sobrevivir el cultivo inicial y provocar la respuesta apropiada (Hartmann y Kester, 1987).

En cuanto a la selección del explante, Murashige (1974) menciona que es importante considerar los siguientes aspectos: el órgano que va a servir como fuente del tejido, la edad fisiológica y ontogenética del órgano, la estación en la cual el explante ha sido obtenido, el tamaño del explante; y particularmente la calidad de la planta.

## **Etapa II. Multiplicación del propágulo.**

El mayor éxito de la etapa II es la rápida multiplicación de propágulos; esto se logra a través del subcultivo repetido hasta obtener el número de propágulos o plántulas deseadas (Torres, 1988).

Este incremento puede ser realizado por varios procedimientos alternativos, ya sea por el desarrollo de yemas axilares y terminales, también por la inducción de brotes adventicios o a través del proceso de embriogénesis somática (Murashige 1974).

## **Etapa III. Enraizamiento in vitro y acondicionamiento.**

Los brotes derivados in-vitro pueden ser inducidos a producir raíces ya sea in vitro durante la etapa III o in-vivo durante la etapa IV (Torres, 1988).

Para Murashige (1974) ésta es la última etapa, en la cual el objetivo final es preparar el propágulo para su sucesiva transferencia al suelo. Esta etapa involucra el enraizamiento de los brotes disectados, endurecimiento de las plantas para impartir alguna tolerancia al estrés de humedad, conferirle un grado de resistencia a ciertos patógenos, y la conversión de plantas desde el estado heterotrófico al estado autotrófico.

A esta etapa Hartmann y Kester (1987) le llaman pretrasplante, mencionando que el propósito de la misma es preparar a las plántulas para su trasplante del medio artificial heterótrofo del tubo de ensaye a una existencia de vida autótrofa en el invernadero y luego en su sitio definitivo.

#### **Etapa IV. Enraizamiento in vivo y Aclimatación.**

Las plantas enraizadas, o sin enraizar, se sacan del recipiente de cultivo, se lava por completo el agar que llevan adherido, para remover una fuente potencial de contaminación y se trasplantan a una mezcla de suelo estándar, esterilizada, en macetas pequeñas en una forma más o menos convencional.

Cuando los brotes son transferidos fuera del frasco de cultivo para su enraizamiento, pueden utilizarse varios materiales como medios de soporte; Torres (1988) enfatiza que generalmente se utilizan mezclas de suelo. entre los cuales destacan la turba, perlita, vermiculita, arena, corteza de árbol y también puede agregarse limo o fertilizante.

La mezcla ideal para enraizamiento tiene que ser de preferencia neutra o ligeramente ácida, con una alta capacidad de retención de humedad y a la vez que provea un buen drenaje y aereación.

La aclimatación es necesaria porque las plántulas derivadas in-vitro no están adaptadas ni establecidas en condiciones in-vivo. Las plantas logran aclimatarse reduciendo gradualmente la humedad relativa en su ambiente; esto se efectúa simplemente reduciendo la cantidad de vapor de agua recibida o haciendo cortes en la bolsa plástica o destapando gradualmente las cajas o macetas en que están contenidas las plántulas. También se ha demostrado en diversos trabajos que el empleo de antitranspirantes en forma de spray resulta benéfico en el endurecimiento del tejido de las plantas (Torres, 1988).

## **2.5. Constituyentes de los medios de cultivo.**

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos son fácilmente observables en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores e inferiores.

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales dependerá del uso del medio nutritivo adecuado, como también del empleo de tejidos viables, incubación, calidad de reactivos, etc. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, así como su forma química adecuada, ha sido posible establecer cultivos para casi la totalidad de las partes de una planta en diversas especies vegetales en estudio experimental.

Los constituyentes del medio de cultivo se pueden clasificar en :

- a) Sales inorgánicas. Mezcla de sales
- b) Compuestos orgánicos
- c) Complejos naturales
- d) Materiales inertes de soporte

**a). Sales inorgánicas. Mezcla de sales.**

Se han llevado a cabo diversas investigaciones con el fin de optimizar las necesidades de plantas específicas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas.

La fórmula de Murashige y Skoog (1962) contiene grandes cantidades de macronutrientes: también contiene una alta concentración de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ . Generalmente se emplean diluciones de 3 a 1 (Cárdenas, 1992).

**b) Compuestos orgánicos.**

Los componentes orgánicos se pueden clasificar en tres grupos: Carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos (Hurtado y Merino, 1987).

### **b.1) Fuentes de carbono.**

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada, y se emplea a una concentración de 2 a 3%; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas (5 a 12%). Ocasionalmente se emplea la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa y el almidón para otras especies.

### **b.2) Sustancias hormonales.**

Entre las sustancias hormonales comúnmente utilizadas se encuentran las auxinas y las citocininas. Las concentraciones varían de especie a especie, pero generalmente las auxinas se usan a una concentración de 0.1 a 10.0 mg/l y las citocininas de 0.03 a 30.0 mg/l.

Las giberelinas (AG3) se emplean en algunas especies para obtener plantas libres de virus, principalmente en cultivos de ápices o meristemos. Su adición en el medio de cultivo no es crítica (Hurtado y Merino, 1987).

### **Aminoácidos y amidas**

Los requerimientos de aminoácidos y/o amidas se pueden determinar rápidamente por medio de la adición de un hidrolizado proteico. Cualquier efecto positivo puede ser investigado por una adición posterior de una mezcla de aminoácidos y amidas en lugar de hidrolizado. Así, un aminoácido o amida específicos pueden detectarse por un proceso de eliminación.

### **c) Complejos naturales.**

Muchas preparaciones de composición indefinida han sido empleadas para enriquecer los medios de cultivos.

Se han utilizado:

- Pulpa de plátano
- Endospermo de coco
- Emulsión de pescado
- Extracto de malta
- Jugo de naranja
- Hidrolizado protéico  
(caseína, lactoalbúmina, peptona y triptona)
- Jugo de tomate
- Extracto de levadura

### **d) Materiales inertes de soporte.**

El agar es el material de soporte más ampliamente usado en el cultivo de tejidos, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento.

Otros agentes gelificantes usados algunas veces en lugar del agar son la poliacrilamida y la silicagel. Cuando se usa medio líquido, el papel filtro usado como puente o plataforma es muy frecuente, así como la fibra de vidrio.

El carbón, en bajas concentraciones, ayuda a adsorber sustancias que se forman como desecho en algunos medios de cultivo. El carbón empleado debe ser muy fino y preferentemente prelavado. (Hurtado y Merino, 1987).

## **2.6. Vitaminas.**

### **2.6.1. Clasificación de las Vitaminas.**

Las vitaminas se dividen generalmente en dos grupos principales: Las liposolubles y las hidrosolubles. Las vitaminas liposolubles, que se encuentran asociados a los lípidos de los alimentos naturales son: las vitaminas A, D, E y K. Las vitaminas del complejo B y la vitamina C son las que forman el grupo de vitaminas hidrosolubles. (Harper, 1975).

Las vitaminas utilizadas en la presente investigación (ac. nicotínico, piridoxina y tiamina) se encuentran en el grupo de las vitaminas hidrosolubles

### **2.6.2. Ac. Nicotínico. (Niacina)**

Esta vitamina es un ácido monocarboxílico de piridina. Es un sólido cristalino blanco. La amida y la sal sódica son biológicamente tan activas como el ácido libre (Mertz, 1971).

El ácido nicotínico funciona como un componente esencial de dos importantes coenzimas, el dinucleótido de nicotinamida adenina y el dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina. El ácido nicotínico está ampliamente distribuido en la naturaleza. Los tejidos animales y las levaduras son la mejores fuentes. Pero las plantas de hoja y las levaduras también suministran cantidades importantes en la dieta. Con la excepción del maíz, los granos

de cereales son buenas fuentes. El ácido nicotínico se sintetiza industrialmente y se emplea por toneladas para el enriquecimiento de la harina blanca y la harina de maíz y en complementos vitamínicos. (Harper, 1975; Mertz, 1971).

### **2.6.3. Piridoxina. (Vitamina B<sub>6</sub>)**

La Piridoxina es un derivado de la piridina, y por lo tanto, está relacionada estructuralmente con el ácido nicotínico. Son sólidos cristalinos blancos, y son ópticamente activos. ( Mertz, 1971).

La función de la piridoxina, es como una coenzima de la decarboxilasas, transaminasas y posiblemente, para ezimas que intervienen en la síntesis de aminoácidos.

La piridoxina se encuentra en los granos de cereales enteros, carne, leche y levaduras de la hoja. La levadura de cerveza desecada es una fuente especialmente rica. (Mertz, 1971).

### **2.6.4. Tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>)**

Puede considerarse como un clorhidrato de pirimidina condensado con un anillo heterocíclico que contiene azufre y tiazol. Es un sólido cristalino blanco que contiene, por molécula, una molécula de agua de cristalización. (Mertz, 1971).

La tiamina está ampliamente distribuida en los tejidos vegetales, animales y microbianos. Las fuentes más ricas son las semillas, en los granos de los cereales, la tiamina está concentrada en el embrión (gérmen) (Mertz, 1971).

### 2.6.5. Vitaminas en Cultivo de Tejidos Vegetales.

A las vitaminas en cultivo de tejidos vegetales se les considera generalmente como cofactores que respaldan actividades enzimáticas; algunas vitaminas que se utilizan comúnmente en cultivo de tejidos vegetales son tiamina, piridoxina, ácido nicotínico, ácido pantoténico entre otros. La única vitamina que ha demostrado tener importancia en cultivos de células y órganos es la tiamina; otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos que al mezclarlas inducen precocidad en violeta africana (*Saintpaula ionanta*). (Lozoya y Zapote, 1989).

Varias vitaminas favorecen el crecimiento de los tejidos en cultivo *in vitro*; por otra parte no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

Sin embargo, la única vitamina a la que se le reconoce habitualmente un efecto claro es la tiamina, aportada generalmente a concentración variable entre 0.1 y 1 mg/lt.

En algunos casos, aportes más importantes (50 a 100 mg/lt) se realizan antes de pasar por el autoclave. No puede excluirse en estos casos que una parte de la actividad observada sea atribuible a productos de su degradación.

Asimismo, a veces se han señalado efectos favorables para el ácido nicotínico, la piridoxina y la riboflavina sobre el crecimiento de los cultivos.

En ocasiones se han utilizado mezclas más complejas de vitaminas. Es posible que estas mezclas puedan resultar útiles, pero su actividad no ha quedado demostrada claramente y su empleo en la mayor parte de los casos, se hace a título preventivo.(Jaques, 1988).

Lozoya y Martínez, (1992) realizó un estudio sobre la interacción medio-vitaminas en orquídeas *in-vitro*; consideró que es necesario utilizar otras opciones de medio de cultivo. Menciona que, utilizó 3 diferentes medios de cultivo los cuales fueron Murashige-Skoog, Knudson y el medio para vainilla de Aguilar-Díaz, los cuales empleó con y sin una mezcla de vitaminas. Las vitaminas utilizadas en la mezcla fueron: la tiamina, pantotenato de Ca, mio-inositol, piridoxina, ac. nicotínico, riboflavina, ac. fólico, biotina y ac. paraaminobenzoico. El máximo peso fresco lo obtuvo en los medios de Aguilar y Murashige sin la mezcla de vitaminas, y el mayor crecimiento se reporta en el medio de Aguilar con la mezcla de vitaminas.

Un estudio realizado en cultivo *in vitro* de raíces de espinaca demostró que la tiamina fue más efectiva como promotor de crecimiento que la piridoxina y el ácido nicotínico, pero a su vez el mejor crecimiento se manifestó con la combinación de las tres vitaminas. La concentración de las tres vitaminas fue de 1.0, 1.0 y 0.8mg/lit respectivamente, el medio de cultivo utilizado fue el MS al 50% suplementado con 1-2% de sacarosa. (Okuse, 1995).

## **2.7. Micropropagación de helechos.**

El cultivo de tejidos de helechos ha sido utilizado desde 1950 aproximadamente y constituye una herramienta experimental para estudiar la potencialidad de desarrollo de los primordios foliares, la diferenciación de tejido gametofítico ó esporofítico. (Hennen y Sheehan, 1978).

La forma de micropropagación de los helechos es por medio del cultivo de esporas o por los estolones.

Para el caso del helecho Boston no se puede micropropagar por cultivo de esporas ya que éstas no son viables, por lo tanto para la propagación in-vitro de *Nephrolepis exaltata* uno de los explantes más utilizados son los estolones (Cooke,1977).

Sin embargo, en especies en donde es posible la obtención de esporas viables, como es el caso de *Platyterium stemaria*, Knauss, citado por Hennen y Sheehan (1978), estableció un método de propagación en cultivo de tejidos por medio de esporas.

### **3.- MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Localización**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (F.A.U.A.N.L.) localizado en el Municipio de Marín, N. L. cuya ubicación geográfica es a los 25° 56' latitud norte y 100° 03' longitud oeste del meridiano de Greenwich, presentando una elevación de 375 m.s.n.m.

#### **3.2. Material de Laboratorio.**

El material y equipo empleados en la presente investigación pueden dividirse en equipo e instrumental, material de cristalería, compuestos químicos y material de laboratorio diverso.

##### **3.2.1 Equipo e Instrumental**

Se usaron los siguientes aparatos: balanza analítica , balanza granataria, horno de microondas, campana de flujo laminar, autoclave, olla de presión, potenciómetro, termómetro, agitador magnético y refrigerador.

##### **3.2.2. Material de Cristalería**

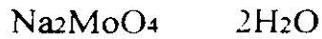
Se utilizaron cajas petri, probetas graduadas de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml, vasos de precipitado de 50, 250, 500 y 1000 ml, agitador manual de vidrio, recipientes de vidrio

(Gerber<sup>MR</sup>) de 130 ml. y pipetas de 0.5, 1, 2, 5 y 10 ml, matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml.

### 3.2.3. Compuestos Químicos.

Los compuestos químicos empleados fueron los siguiente

- a) Agentes desinfectantes:
  - Alcohol etílico.
  - Detergente.
  - Cloralex<sup>MR</sup> (Hipoclorito de Sodio).
  - Tween-20.
  
- b) Macronutrientos.
  - $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .
  - $\text{KNO}_3$ .
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  
- c) Micronutrientos.
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
  - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$



d) Vitaminas

Acido Nicotínico.

Piridoxina.

Tiamina.

e) Reguladores de Crecimiento

Bencil Amino Purina (BAP).

Acido Naftalenacético (NAA).

### 3.2.4 Material de Laboratorio Diverso.

Otros utensilios usados fueron: lámparas de alcohol, pinzas de disección, mango y hojas de bisturí, espátulas, pissetas, algodón, charolas, papel secante, papel aluminio, papel filtro, tapas de poliestireno, estantería metálica, regla métrica y cepillos de cerdas suaves

## 3.3. Establecimiento in vitro

### 3.3.1 Selección de la Planta Madre.

La selección de la planta madre o donadora es importante ya que sus características serán transmitidas a otras generaciones. Por tal motivo se debe observar perfectamente sus características fenotípicas.

La planta donadora se obtuvo en el Vivero El Canadá de la F.A.U.A.N.L. en Escobedo, N. L.

### **3.3.2. Obtención del Explante**

Los explantes utilizados en la presente investigación para la obtención de plántulas in-vitro fueron los estolones de la planta madre, los cuales se cortaron aproximadamente de 10cm de largo y se requirió que no se encontraran lignificados. Se eliminó 2 cm de cada extremo y después se cortaron de 2 cm de largo cada estolón.

### **3.3.3. Desinfección del Explante.**

Con el propósito de obtener explantes en condiciones asépticas, los estolones se sometieron primeramente a un tratamiento de predesinfección el cual consistió en limpiar con un cepillo de cerdas finas con detergente y agua; posteriormente: se mantuvieron una hora en agua corriente.

Para la desinfección, los explantes se colocaron en una gasa para sumergirlos en alcohol al 70% durante 30 seg. y por último permanecieron en hipoclorito de sodio al 10% (v/v) durante 10 min.

### **3.3.4. Siembra del Explante**

Antes de realizar la siembra, y con el objeto de eliminar restos del agente desinfectante y a la vez prevenir oxidación, los explantes se enjuagaron 3 veces con una solución esterilizada de ácido ascórbico y ácido cítrico a razón de 100 mg/lt cada uno.

Los explantes se sembraron en el medio de cultivo de Murashige - Skoog (1962)

Macronutrientes	(mg l <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
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
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	
Micronutrientes	
KL	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.625
Na <sub>2</sub> .EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8

Con el objeto de obtener mayor precisión en los nutrimentos en listados se procedió a la elaboración de las siguientes soluciones concentradas.

SOLUCION A.-	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O, 22.0 g	1000x aforado a 50 ml
SOLUCION B.-	KNO <sub>3</sub> , 1.9 g l <sup>-1</sup>	se pesan y se agregan directo al medio
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 1.65 g l <sup>-1</sup>	
SOLUCION C.-	KL, .0415 g	1000x aforado a 50 ml
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, .00125 g	
SOLUCION D.-	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 3.4 g	400x aforado a 50 ml
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 0.124 g	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0.005 g	
SOLUCION E.-	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 7.4 g	400x aforado a 50 ml
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O, 0.44 g	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0.172 g	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O, 0.050 g	
SOLUCION F.-	F <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0.557 g	200x aforado a 100 ml
	Na <sub>2</sub> EDTA, 0.745 g	

La solución G consta de una mezcla vitaminas, glicina, piridoxina, ácido nicotínico y tiamina.

La solución G no se incluyó en el medio de cultivo ya que lo que se va a probar en esta investigación es el efecto de las vitaminas por lo tanto la tiamina el ácido nicotínico y la piridoxina se utilizaron para preparar los tratamientos

A este medio se le agregaron 8 g de agar/l, ajustando el pH a 5.7

Los explantes se sembraron en recipientes de alimento infantil de 130 ml que contenían el medio Murashige-Skoog.

Se prepararon 20 frascos con el medio MS colocando 2 explantes por frasco, (sin perder la polaridad del explante) posteriormente se pasaron al cuarto de incubación el cual se encuentra a una temperatura de 25°C con un fotoperíodo de 16 hrs luz . En estas condiciones permanecieron durante 8 semanas.

De los 20 frascos sembrados se logró obtener 5 plántulas asépticas las cuales se utilizaron en la fase de proliferación.

### **3.4. Fase de Proliferación**

Se utilizó el mismo medio de cultivo (Murashige-Skoog, 1962), sin vitaminas y suplementado con los siguientes reguladores de crecimiento: BAP (Bencil-amino-purina) 5mg/lt y NAA (ácido-naftalenacético) 0.5mg/lt, con 8 g de agar/lt y ajustado a un pH de 5.7.

Se subcultivaron las plántulas asépticas y se colocaron en el medio de cultivo durante 2 semanas, las cuales formaron propágulos (conjunto de multiyemas) utilizados en el experimento.

Al obtener suficientes propágulos se procedió a preparar los tratamientos para el experimento de proliferación, en el cual se utilizó:

Un medio de cultivo Murashige-Skoog sin vitaminas para después preparar los tratamientos con vitaminas, sin reguladores de crecimiento con 8 g de agar/lt y ajustado a un pH de 5.7.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1.- Tiamina 0.5mg/lt
- 2.- Ac. Nicotínico 0.5 mg/lt
- 3.- Piridoxina 0.5 mg/lt
- 4.- Combinación de las 3 vitaminas 0.5 mg/lt  
(tiamina, ácido nicotínico y piridoxina)
- 5.- Testigo.

Cada tratamiento constó de 5 repeticiones.

Se colocaron 6 propágulos por frasco y se pasaron al cuarto de incubación con una temperatura 25°C y un fotoperíodo de 16 hrs luz durante 6 semanas para después evaluar las siguientes variables:

- a) Número de Propágulos.
- b) Número de Propágulos con Brote.
- c) Número de Brotes por Propágulo.

**Número de Propágulos.-** Para esta variable se realizó un conteo de todos los propágulos por frasco.

**Número de Propágulos con Brote.-** Se realizó conteo de propágulos que presentaban brote, donde era evidente el desarrollo de “frondas” de al menos de 5 mm.

**Número de Brotes por Propágulo.-** Se realizó un conteo de brotes por cada propágulo, por frasco ( Se consideraron como brotes aquellos que presentaron frondas de al menos 5 mm.).

En el experimento, para evaluar las variables Número de Propágulos y Número de Propágulos con Brote, los tratamientos se distribuyeron siguiendo un diseño experimental completamente al azar con 5 repeticiones.

El modelo estadístico lineal utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Es la observación del tratamiento  $i$  en la repetición  $j$ .

$M$  = Es el efecto verdadero de la media general.

$T_i$  = Es el efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$E_{ij}$  = Es el error experimental.

Este diseño es el más adecuado para trabajos en el laboratorio. Se utiliza cuando las unidades experimentales son homogéneas, de tal manera que no es posible identificar un gradiente de variabilidad entre ellas. ( Olivares, 1993 )

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

Al subcultivar las plántulas asépticas al medio de cultivo con los reguladores de crecimiento (BAP 5mg/lit y NAA 0.5mg/lit) durante 2 semanas, estos provocaron la formación de propágulos (conjunto de multiyemas) los cuales se utilizaron en el experimento.

Estos propágulos se originaron de una yema de la base de la plántula que se encontraba en contacto con el medio de cultivo. Lo anterior coincide con lo señalado por Hennen y Sheehan, (1978); donde la multiplicación de los brotes ocurre en 3 áreas del explante: en las yemas adventicias formadas a partir de la base del explante, en raíces formadas en el cultivo y en las frondas producidas en el explante en contacto con el medio.

A continuación se muestran los resultados de cada variable obtenidos en el experimento.

Los resultados de la variable número de propágulos por repetición, se analizaron utilizando la metodología de un diseño completamente al azar; la tabla de análisis de varianza se muestra a continuación

Cuadro 1. Análisis de varianza para la variable Número de Propágulos por repetición.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	132.496826	33.124207	6.4436**	0.002
Error	20	102.812744	5.140637		
Total	24	235.309570			

C.V. = 22.72 %

\*\* = Altamente significativo

Como la F calculada es mayor que la F tabulada (con un nivel de significancia del 1 %), puede concluirse que existe diferencia altamente significativa entre el efecto medio de los tratamientos (tiamina, ac. nicotínico, piridoxina, combinación de las 3 vitaminas y el testigo).

Considerando la decisión obtenida en la tabla de análisis de varianza, se procedió a efectuar una comparación múltiple de medias utilizando el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS).

Cuadro 2. Comparación de Medias de la Variable Número de Propágulos por repetición.

Tratamiento	Media
1	13.2463 A
4	10.6570 AB
2	10.6326 AB
5	9.1456 BC
3	6.2050 C

Nivel de significancia = 0.05

DMS = 2.9913

De acuerdo con los resultados obtenidos de la comparación de medias podemos concluir que la tiamina mostró un número promedio de propágulos por repetición, mayor; y la piridoxina mostró un número promedio de propágulos por repetición, más bajo. Lo anterior coincide con lo mencionado por (Jacques, 1988) quien menciona que la tiamina es la única vitamina a la que se le reconoce efectos claros en cultivo de tejidos.

Sin embargo, la combinación de las tres vitaminas y el ac. nicotínico no difirieron significativamente de la tiamina así mismo que el testigo y la piridoxina iguales significativamente pero diferentes numéricamente entre sí.

En la Figura 1, se muestran los resultados de los tratamientos de la variable número de propágulos por repetición, en donde se aprecia que la tiamina obtuvo un mayor número promedio de propágulos con relación a los demás tratamientos.

Para la variable Número de Propágulos con Brote, el análisis de varianza se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Análisis de varianza para la variable número de propágulos con brote.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	4	106.138306	26.534576	3.6024*	0.023
Error	20	147.315094	7.365755		
Total	24	253.453400			

C.V.= 68.24%

\* = Significativo.

El análisis de varianza indica que existe diferencia significativa entre los efectos medios de tratamientos, debido a que la F calculada es mayor que la F tabulada (con un nivel de significancia del 1 %).

En base a los resultados obtenidos en el análisis de varianza, se realizó una comparación múltiple de medias utilizando el método de Diferencia Mínima Significativa.

Cuadro 4. Comparación de medias para la variable número de propágulos con brote

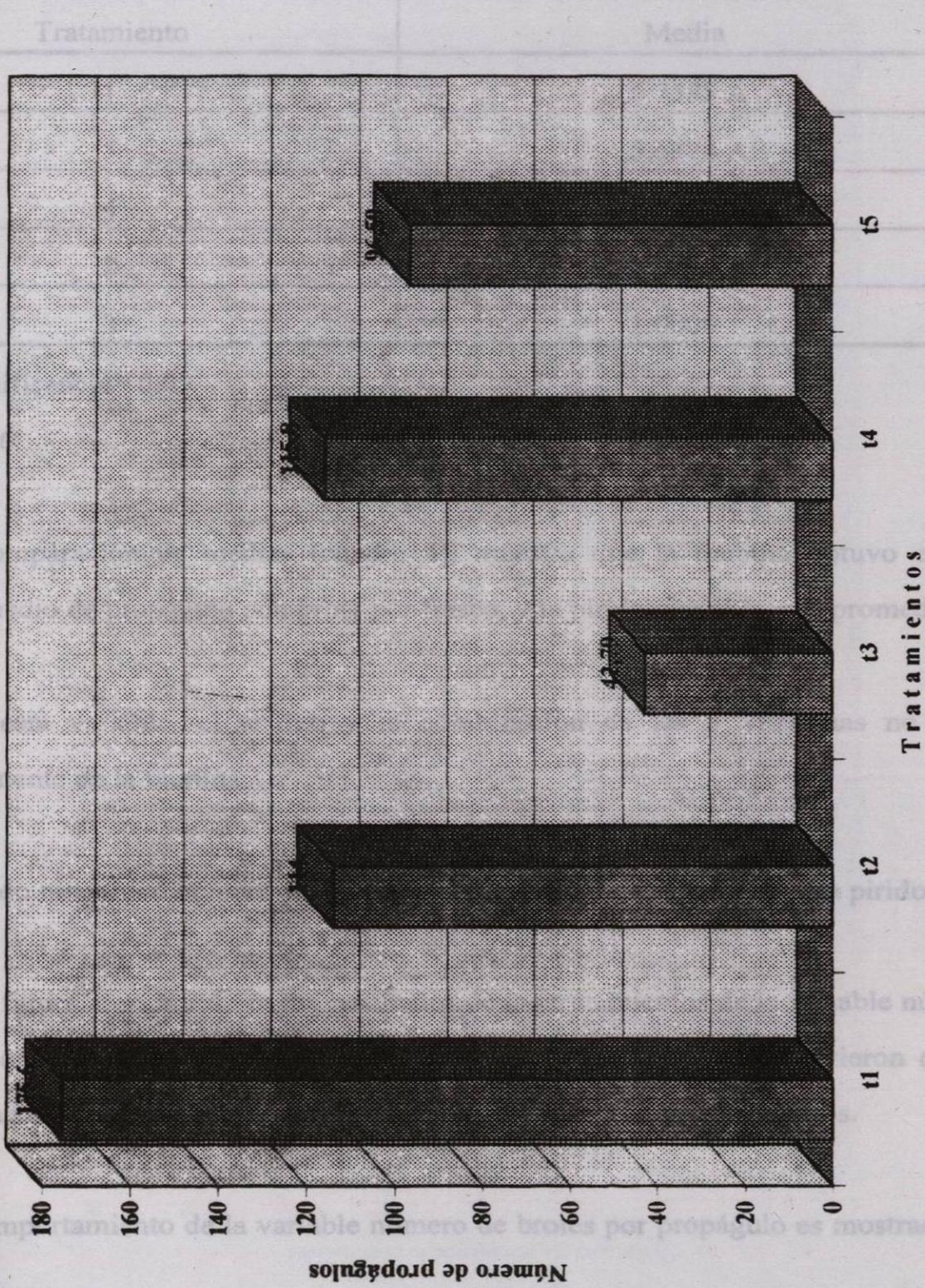


Fig. 1. Resultados de los tratamientos para la variable número de propágulos

Cuadro 4. Comparación de medias para la variable número de propágulos con brote .

Tratamiento	Media
1	6.7585 A
5	5.6874 AB
4	3.7459 ABC
2	2.6926 BC
3	1.0000 C

Nivel de significancia= 0.05

DMS= 3.5806

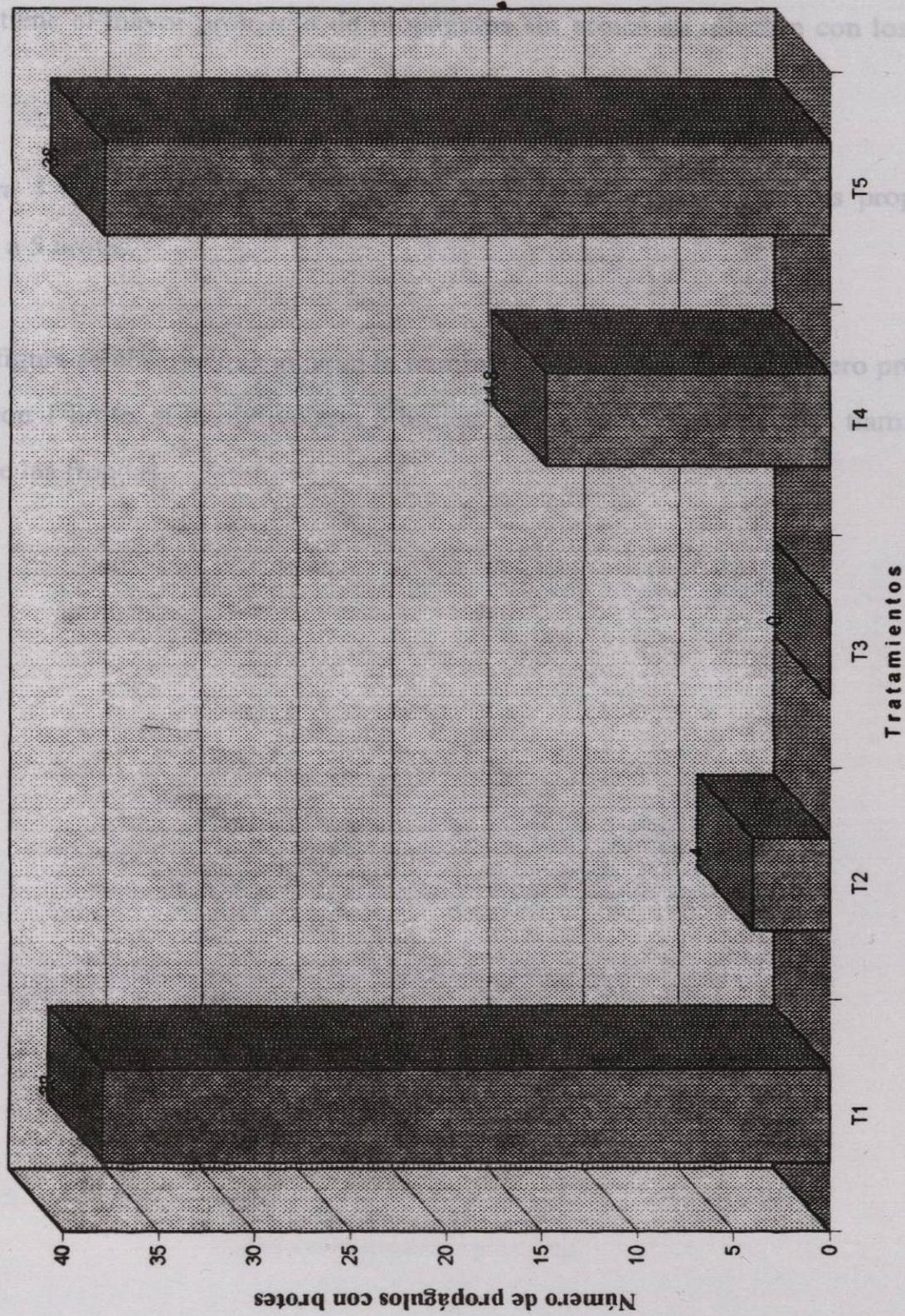
La comparación de medias (cuadro 4), muestra que la tiamina obtuvo el mayor número promedio de propágulo con brote por frasco, y la piridoxina el menor promedio.

Para esta variable, el testigo y la combinación de las 3 vitaminas no difieren significativamente de la tiamina.

El ácido nicotínico no muestra diferencia significativa con respecto a la piridoxina.

En la figura 2, se muestran los resultados de los tratamientos de la variable número de propágulos con brotes, en donde se aprecia que la tiamina y el testigo tuvieron el mayor número promedio de propágulos con brote en relación a los demás tratamientos.

El comportamiento de la variable número de brotes por propágulo es mostrado en las figuras 3 y 4.



**Fig. 2. Resultados de los tratamientos del número de propágulos con brotes**

En la figura 3 se muestra el número de propágulos sin brotes. En donde se observa que la tiamina tiene el mayor promedio de propágulos sin brotes en relación con los demás tratamientos.

La figura 4 muestra el comportamiento de los tratamientos cuando los propágulos obtuvieron de 1 a 5 brotes.

En esta figura se observa que aunque la tiamina no obtuvo el mayor número promedio de propágulos con 1 brote, sí lo obtuvo con 5 brotes; esto nos indica que con la tiamina hay más brotación de las frondas.

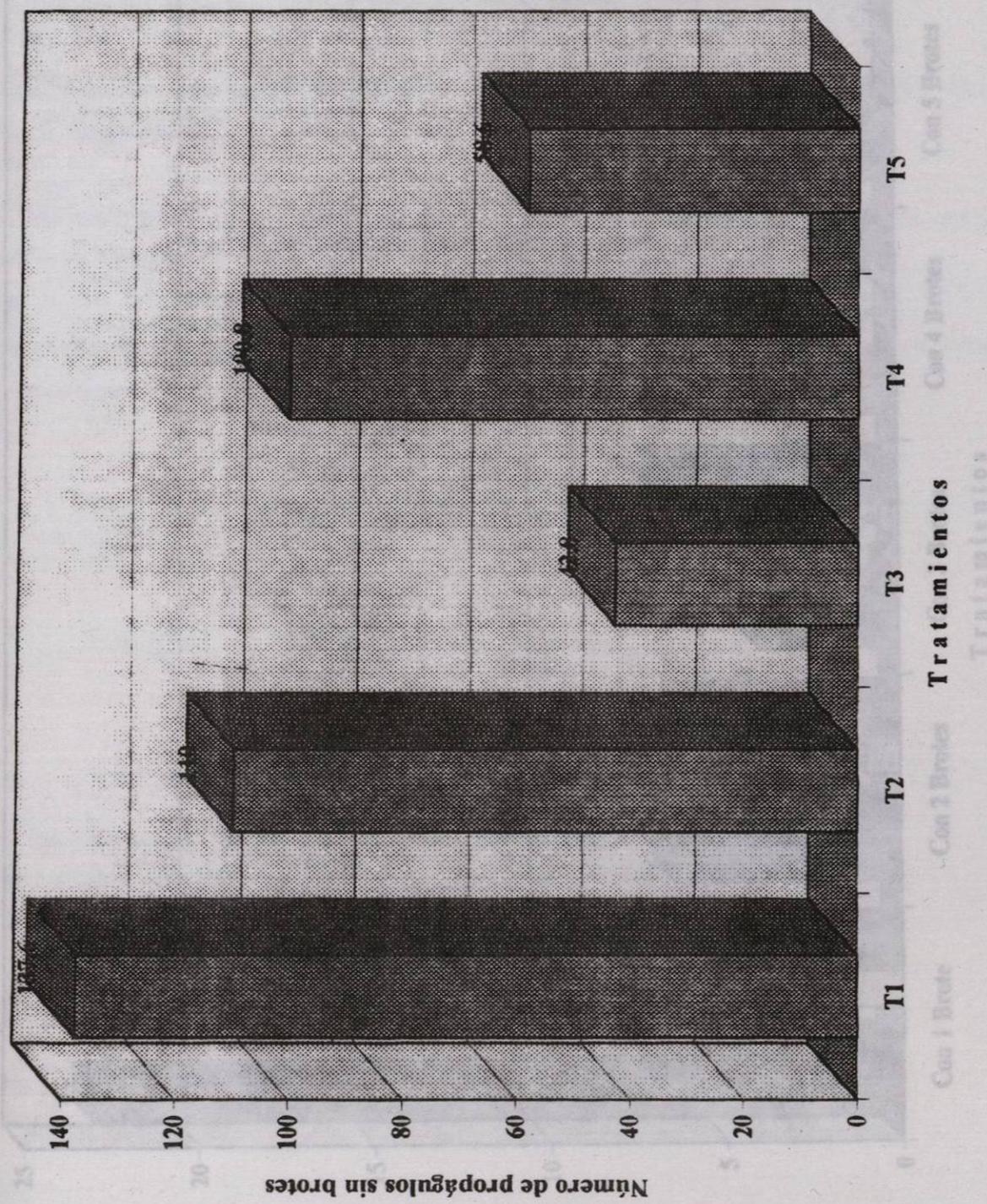


Fig. 3. Número de propággulos sin brotes

# CONCLUSIONES

## 5.1 Conclusiones.

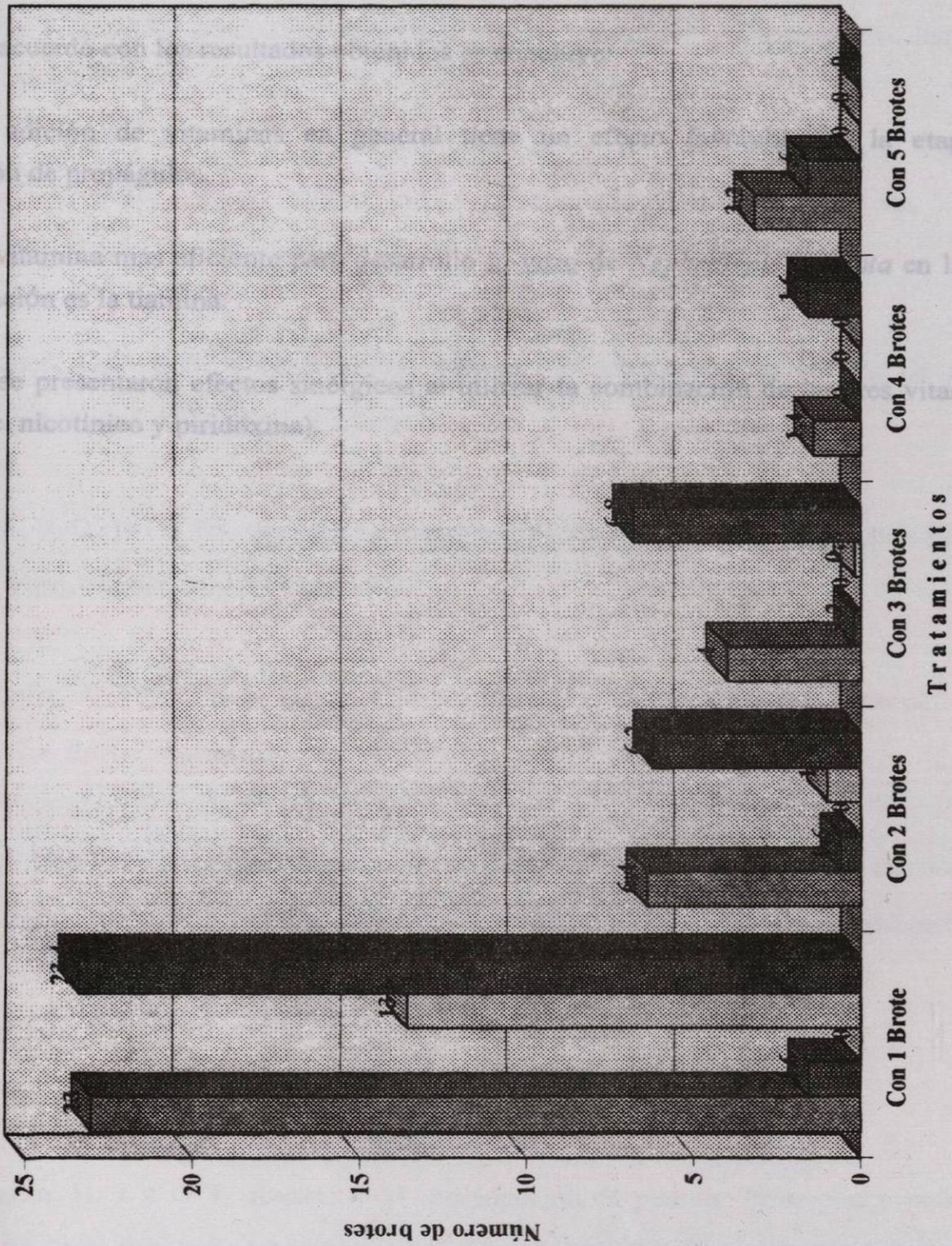


Fig. 4. Comportamiento de los tratamientos al obtener los propágulos de 1 a 5 brotes

## CONCLUSIONES

### 5.1 Conclusiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye:

La adición de vitaminas en general tiene un efecto favorable en la etapa de proliferación de propágulos.

La vitamina más eficiente para desarrollo in-vitro de *Nephrolepis exaltata* en la fase de proliferación es la tiamina.

No se presentaron efectos sinérgicos al utilizar la combinación de las tres vitaminas (tiamina, ac. nicotínico y piridoxina).

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bailey, L.H. 1977. Manual of cultivated plants. Macmillan publishing Co. Inc. New York.
- 2.- Browne, J. 1980. Cultivar Flores. Instituto Parramon. Ediciones. Barcelona, España, pag. 4-8.
- 3.- Cárdenas, C.E. y R. Salazar. 1993. Manual de laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.FAUANL 7, 8 y 9.pp
- 4.- Cooke, R. C. 1977. The use of Agar substitute in the initial growth of Boston Ferns in vitro. HortScience 12 (4): 339.
- 5.- Cronquist, A. 1977. Introducción a la Botánica. Tr. Antonio Marino Ambrosio. 2ed. Cía. Edit. Continental.
- 6.- FIRA. 1985. Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura; División de agricultura, horticultura ornamental. México, División de Divulgación y Publicaciones de FIRA.
- 7.- Harper, H. A. 1975. Manual de química fisiológica. México. pag. 94.
- 8.- Hartmann, H. T y D. E. Kester. 1987. Propagación de plantas. Principios y prácticas. CECSA. Primera ed. México, d. F. pag. 549-551, 573, 599, 605 y 607.

- 9.- Hennen, G. R. and T.J. Sheehan. 1978. In vitro propagation of *Platyserium stemaria* (Beauvois) Desu. HortScience 13(3): 245.
- 10.- Hurtado, M D y M.E. Merino. 1987. Cultivo de tejidos vegetales.. Ed. Trillas. México pp. 67-73.
- 11.- Jacques. M 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro los meristemas y la organogénesis. España.
- 12.- Krikorian. A. D. 1991. Propagación clonal in vitro. En: W.M. Roca y L.A. Mnoginski (ed). Cultivo 95-125. pp
- 13.- Lozoya, H. y P. Martínez. 1992. Interacción medio-vitaminas en dos especies de orquideas in vitro. XIV Congreso Nacional de Fitogenética. Tuxtla Gutiérrez. Chiapas. 23 pp.
- 14.- Lozoya, H. y J.G. Zapote. 1989. Influencia de cofactores y el medio físico en la diferenciación y desarrollo de violeta africana (*Saintpaula ionanta*). Memorias III Congreso de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas. 76 pp.
- 15.- Mertz, E.T. 1971. Bioquímica. México. 229, 239, 240, 241, 242, 243 y 344 pp.
- 16.- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-66 pp.

- 17.- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-479 pp.
- 18.- Olivares, S. E. 1993. Notas de diseños experimentales con aplicación a la experimentación agrícola y pecuaria. Marín. FAUANL. 15. p
- 19.- Okuse, I. 1995. In vitro of excised roots in spinach (*Spinacia oleracea L.*). *Bulletin of the Faculty of Agriculture*. Hirosaki, University
- 20.- Torres, K. 1988. Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold. New York. 31, 34, 53-60, 66-68. pp.
- 21.- Villalobos, V. M. y T. A. Thorpe. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. En: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds). *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. CIAT. Colombia 127-141. pp.
- 22.- Wright, Michael. 1978. *Guía práctica ilustrada para el jardín*. Barcelona, España.

