

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

**Micropropagación de *Pteridium aquilinum*
(L.) Kuhn**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Ana Belén Adame González

TUTORA

DRA. MARÍA ISABEL SAAD VILLEGAS



2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado	
1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta	1. Datos del alumno Adame González Ana Belén 55132386 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 302061983
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dra. María Isabel Saad Villegas
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dr. Manuel Jiménez Estrada
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 M. en C. María Eugenia Muñiz Días de León
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 M. en C. Beatriz Zuñiga Ruiz
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Biól. Felipe de Jesús Eslava Silva
7. Datos del trabajo escrito Título Número de páginas Año	7. Datos del trabajo escrito Micropropagación de <i>Pteridium aquilinum</i> (L.). Kuhn 66 2011

El presente trabajo se realizó dentro de las actividades del Taller de Fitorremediación de compuestos orgánicos y sustancias tóxicas en suelos y cuerpos de agua, en las instalaciones del Taller de Biología Molecular de la Célula I y II y del Taller de Biología de Plantas I y II de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos.

A mi asesora, Dra. María Isabel Saad Villegas por el apoyo y dedicación prestados a esta investigación.

A los maestros y doctores que apoyaron en la culminación de esta tesis, Dr. Manuel Jiménez Estrada, M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León, M en C. Beatriz Zuñiga Ruiz y Biól. Felipe de Jesús Eslava Silva.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar y por ser la institución que me ha formado humana y científicamente.

A mis compañeros de taller, Felipe, Adri, Ale, Rosa y Diana por hacer más agradable mi estancia y por su aliento para concluir este trabajo.

Dedicatoria.

Agradezco y dedico este trabajo especialmente a mi familia por ser la base de mi formación como ser humano y de mi educación.

A mi mamá Lidia y a mi papá Rodolfo por ser el sostén moral y económico para poder concluir mi carrera profesional.

A mis hermanos y hermanas, Carlos, Araceli, Maricela, Paulo y Dulce por sus consejos y cariño.

A mis cuñados, Ana y Germán por ser parte de esta maravillosa familia y

A mis sobrinos Osvaldo y Mariana por ser dos angelitos que se han dado una nueva luz a nuestra familia.

1 ÍNDICE

1	ÍNDICE.....	6
2	ABREVIATURAS	7
3	RESUMEN	8
4	INTRODUCCIÓN	10
5	MARCO TEÓRICO.....	12
5.1	Contaminación	12
5.1.1	Contaminación del suelo	12
5.1.2	Origen de la contaminación del suelo	13
5.1.3	Metales Pesados	15
5.1.4	Contaminación por metales pesados en México	15
5.2	Remediación	17
5.3	Biorremediación.....	19
5.4	Fitorremediación	20
5.4.1	Remediación por helechos.....	21
5.5	Cultivo de tejidos vegetales	22
5.6	Micropropagación	23
5.6.1	Ventajas de la micropropagación	25
5.6.2	Desventajas de la micropropagación	26
5.6.3	Respuesta morfogénica.....	26
5.6.4	Reguladores de crecimiento vegetal	27
5.7	Cultivo <i>in vitro</i> en helechos	29
5.8	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	31
6	JUSTIFICACIÓN	33
7	OBJETIVOS.....	33
7.1	Objetivo general:.....	33
7.2	Objetivos particulares:	33
8	MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
8.1	Estrategia desarrollada	34
8.2	Material biológico.....	36
8.3	Medio de cultivo	36
8.4	Desinfección de esporas.....	36
8.5	Germinación.....	36
8.6	Desarrollo del esporofito	37
8.7	Rizogénesis	37
8.8	Micropropagación	37
8.9	Aclimatización	38
8.10	Análisis histológico	39
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
9.1	Obtención de material aséptico	41
9.2	Micropropagación	41
9.2.1	Raíz y fronda	41
9.2.2	Rizoma.....	43
9.3	Aclimatización	52
9.4	Análisis histológico.....	53
10	CONCLUSIONES	54
11	PERSPECTIVAS A FUTURO	55
12	ANEXOS	56
13	BIBLIOGRAFÍA	59

2 ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina o Benciladenina
Kn	Cinetina
TDZ	Thidiazurón
2, 4-D	2, 4 Diclorofenoxiacético
As	Arsenico
Cd	Cadmio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cs	Cesio
Cu	Cobre
Fe	Hierro
Hg	Mercurio
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
Ni	Niquel
Pb	Plomo
Se	Selenio
Sn	Estaño
Sr	Estroncio
U	Uranio
Zn	Zing

3 RESUMEN

Algunas plantas son capaces de acumular metales pesados como Ni, Zn, Cr, Cd, As o Se de forma natural, lo que las hace potencialmente útiles para la fitorremediación de sitios contaminados por estos metales. La utilización de especies vegetales para la remoción de contaminantes en el campo depende de la generación de protocolos eficientes de reproducción para estas especies y de la implementación de programas de mejoramiento. El helecho *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn ha sido encontrado, por varios autores, en lugares contaminados por metales pesados y radionucleótidos, por lo que tiene gran potencial como especie biorremediadora. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una técnica de micropropagación de *Pteridium aquilinum* como el primer paso para establecer una metodología de selección y mejoramiento de la especie.

A partir de cultivos in vitro de *Pteridium aquilinum* derivados de la germinación de esporas, se probó el potencial de regeneración de tres tipos de explantes: hoja, rizoma, y raíz en medio de inducción MS adicionado con ANA, 2,4-D, BAP o cinetina con diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0mg/L) y thidiazurón (0.05, 0.1 y 0.2 mg/L). El único explante que dio respuesta fue el rizoma. Se generaron gametofitos en todos los tratamientos probados pero con diferente eficiencia. El mayor porcentaje de respuesta (100%) se presentó en 0.5 mg/L de BAP, mientras respecto al peso promedio fue mayor en 2 mg/L de cinetina. Se generaron esporofitos de manera directa en todos los tratamientos excepto con BAP. El mayor número de esporofitos obtenidos (17) se presentó con 0.5 mg/L de 2,4-D. Posteriormente se realizó un análisis histológico para identificar cambios en la anatomía de los individuos obtenidos *in vitro*. Los individuos obtenidos de la micropropagación se aclimataron en condiciones de invernadero. Para los gametofitos se observó la presencia de estructuras reproductoras tanto de anteridios como de arquegonios. Para el esporofito, en corte transversal del rizoma se observó un dictiostele, característico del esporofito originado a partir de esporas, así como la presencia de estomas y traqueidas areoladas en las pinas, lo que nos indica que no hay una variación en la morfología de los helechos obtenidos a partir del proceso de micropropagación. El proceso de regeneración

tanto de gametofito como de esporofito fue mediante la organogénesis directa a través de un proceso de reproducción aespórico para los gametofitos, por lo que este protocolo puede establecerse como el primer paso para el mejoramiento de la especie en su capacidad de acumular metales pesados.

4 INTRODUCCIÓN

El incremento en las actividades industriales, agrícolas, mineras y urbanas ha contribuido a la contaminación del medio ambiente y por tanto a su deterioro. Debido a esto, en las últimas décadas del siglo XX, surgieron tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para remediar suelos o emplazamientos contaminados y recuperar los ecosistemas afectados. Cuando estas tecnologías se basan en el uso de plantas, reciben el nombre de fitorremediación. La fitorremediación se define como el uso de plantas para eliminar los contaminantes del entorno o para reducir su peligrosidad (Vidali, 2001; Cunningham *et. al.*, 1995; Carpena y Bernal, 2007).

La fitorremediación de suelos contaminados ocupa el uso conjunto de plantas, enmiendas del suelo y técnicas agronómicas para eliminar, retener o disminuir la toxicidad de los contaminantes. Esta tecnología reúne un gran número de ventajas, es poco invasiva, económica, no utiliza reactivos químicos peligrosos, ni afecta negativamente a la estructura del suelo, aplica prácticas agrícolas comunes; y los procesos de limpieza se realizan '*in situ*' lo que evita costosos transportes. Se puede aplicar remediación con plantas tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos, presentes en sustratos sólidos, líquidos o en el aire (Cunningham *et. al.*, 1995; Chaney *et. al.*, 1997).

Algunas plantas son capaces de acumular metales pesados como Ni, Zn, Cd, As o Se de forma natural, lo que las hace potencialmente útiles para la biorremediación de sitios contaminados por estos metales (Krâmer, 2005). La utilización de especies vegetales para la remoción de contaminantes en campo depende de la generación de protocolos eficientes de reproducción, para estas especies y de la implementación de programas de mejoramiento.

El cultivo de tejidos vegetales es el conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos vegetales e incluso, la obtención de plantas completas a partir de pequeñas porciones de plantas, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas (Roca y Mroginski, 1991; Pérez *et. al.*, 1999; Chawla, 2002).

Esta herramienta biotecnológica ha sido invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y por otro lado, tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal. En este sentido el éxito de las técnicas de selección y manipulación genética *in vitro* de plantas depende en gran medida de la regeneración exitosa de la planta en condiciones controladas (Pérez, 1999; Chawla, 2002). Por lo que resulta una herramienta muy valiosa para el estudio, reproducción y mejoramiento genético de plantas con potencial fitorremediador.

Pteridium aquilinum L. Kunh es una pteridofita perteneciente a la familia Dennstaedtiaceae, que tiene una amplia distribución a nivel mundial. Es conocida en varios países como helecho de potrero, o macho, suele tener predilección por suelos ácidos y regiones montañosas, pero puede persistir en un amplio rango de condiciones ambientales, debido a su habilidad de almacenar una gran cantidad de recursos en sus rizomas, a su rápida producción de frondas en primavera y al desarrollo de un dosel denso. No se ve afectada por el ganado, la herbivoría, ni otros patógenos y tiene propiedades alelopáticas (Marrs y Watt, 2006).

Varios autores han reportado el crecimiento de *P. aquilinum* en lugares contaminados por metales pesados (Ar, Cd, Pb y Cr) y radionucleótidos (Cs y Sr), así como su capacidad de acumular estos contaminantes en sus tejidos (Tyson *et. al.*, 1999^a; Tyson *et. al.*, 1999^b; Chang *et. al.*, 2005; Anawar *et. al.*, 2006; Barriada *et. al.*, 2009; Eslava, 2009).

5 MARCO TEÓRICO

5.1 Contaminación

Contaminación ambiental es la presencia en la biosfera de cantidades elevadas de materia o energía propia o ajena a ella, que perjudica su funcionamiento. La contaminación provocada por sustancias específicas, puede tener origen natural mediante procesos geológicos o biológicos, o bien puede ser un derivado de las actividades antropogénicas (Newman y Unger, 2002; Scullion, 2006).

5.1.1 Contaminación del suelo

5.1.1.1 Suelo

La formación de suelo es el resultado de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos sobre el medio rocoso original. Su formación depende de varios factores tales como: la roca parental, el clima, el relieve, la actividad de los organismos y el tiempo transcurrido. La interacción de estos factores influye directamente en las propiedades específicas de cada tipo de suelo, y éste a su vez interviene en la dinámica de los ecosistemas terrestres (Aguilera, 1989; Porta *et. al.*, 1999).

El suelo permite el establecimiento de vida sobre la tierra, ya que encontramos como parte de su composición, nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de microorganismos, plantas y animales. Así mismo, es un medio de transición para los ciclos biogeoquímicos, que permite la interacción entre la litosfera y la biosfera, ya que el suelo es el lugar donde los elementos del ambiente pasan a los organismos. También regula la composición del agua debido a que los elementos pueden quedar inmovilizados en el suelo y posteriormente ser movilizados cuando se infiltra el agua, cambiando su composición. Otro proceso de suma importancia que se da en el suelo es la descomposición de materia orgánica, proceso que a su vez está implicado en la formación del suelo, por lo que el suelo no sólo es un factor de entorno para los organismos, también es resultado de su existencia (Porta *et. al.*, 1999; Odum y Barrett, 2006).

5.1.2 Origen de la contaminación del suelo

El impacto ambiental que está ejerciendo el hombre sobre el suelo, ha originado graves problemas de contaminación que necesitan una solución urgente, debido a los riesgos directos que los suelos contaminados pueden ejercer sobre la salud humana y a razones económicas derivadas de su limitación de uso y devaluación de los terrenos contaminados (Orozco *et. al.*, 2003).

El suelo ha sido utilizado tradicionalmente como sitio de depósito de todos los desechos generados por el hombre desde tiempos prehistóricos. Esto antiguamente no era un problema, puesto que la concentración de tales desechos era muy baja. Sin embargo, el rápido crecimiento poblacional ha rebasado la capacidad natural de degradación, y además, hay productos nuevos derivados de la actividad minera e industrial que no son biodegradables, que persisten en el ambiente por largo tiempo o que son tóxicos para los microorganismos del suelo, para las plantas, los animales y el hombre (Tan, 1994; Pierzynski *et. al.*, 2000; Orozco *et. al.*, 2003).

Se considera suelo contaminado a una porción de terreno, superficial o subterránea, cuya calidad ha sido alterada como consecuencia del vertido, directo o indirecto, de residuos o productos peligrosos. El origen de las alteraciones que se producen en el suelo es vasto y los tipos de contaminantes generados son igualmente variados.

Las principales fuentes antropogénicas de contaminación del suelo son:

- a) Fuentes agroquímicas. Estos desechos incluyen los fertilizantes, pesticidas, y residuos de plantas y animales provenientes de las actividades agropecuarias. Muchas de estas sustancias se reincorporan al suelo por los procesos de desintegración y degradación llevados a cabo por la microbiota. Sin embargo, el uso excesivo e inadecuado de los productos agrícolas puede causar contaminación en el ambiente (Mirsal, 2004).

- b) Fuentes urbanas. La fuente principal de contaminación urbana del suelo son los desechos domésticos. Dentro de éstos, encontramos los residuos sólidos, que tradicionalmente son depositados y confinados en extensas áreas de suelo. Este hecho ha contribuido enormemente a la contaminación del suelo y a su vez de los mantos acuíferos. Otra fuente urbana de contaminación del suelo está relacionada con las actividades de transporte, ya que las sustancias liberadas por los automóviles llegan por deposición al suelo.
- c) Fuentes industriales. La inadecuada disposición de los desechos originados en zonas industriales es un grave problema ya que de esta actividad se generan desechos tanto gaseosos, como líquidos y sólidos, que afectan la calidad del suelo de manera importante.
- d) Minería. La extracción de metales y los desechos que la actividad minera genera son una fuente de contaminación que altera significativamente el suelo, debido a que los procesos de beneficio y fundición de metales, son muy agresivos y dañan enormemente al ambiente. Además, el suelo es utilizado intensivamente como sitio de deposición de los residuos generados por los procesos de obtención de metales, agravando significativamente el problema de contaminación por metales pesados.

Enseguida se enlista los principales contaminantes generados por estas actividades.

Contaminantes orgánicos	Contaminantes inorgánicos
▪ Hidrocarburos ▪ Hidrocarburos clorados ▪ Hidrocarburos aromáticos policíclicos ▪ Bifenilos policlorinados ▪ Bifenilos polibrominados ▪ Clorofluorocarbonos ▪ Disolventes orgánicos ▪ Pinturas/lacados	▪ Plomo ▪ Cromo ▪ Cianuro ▪ Arsénico ▪ Cadmio ▪ Mercurio ▪ Aluminio ▪ Selenio ▪ Cobre ▪ Níquel ▪ Manganeso ▪ Zinc

5.1.3 Metales Pesados

Dentro de los contaminantes inorgánicos encontramos a los metales pesados. Éstos tienen importancia biológica puesto que algunos de ellos son esenciales para el desarrollo y crecimiento de los seres vivos, ya que funcionan como macronutrientes o micronutrientes. Sin embargo, algunos otros no cumplen con estas funciones y son sumamente tóxicos aún en bajas concentraciones. Los metales pesados también tienen importancia económica debido a sus innumerables usos dentro de las diferentes industrias, en especial la industria minera, siendo ésta la principal fuente de contaminación por dichos elementos.

Los metales pesados se definen como aquellos elementos que tienen una densidad mayor de 5g/cm^3 en su forma elemental. Este grupo abarca 38 elementos, 12 de los cuales son los más utilizados y descargados en residuos mineros e industriales al medio ambiente: Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Zn. Dentro del grupo de metales tóxicos, también se incluye al As y al Se, aunque no son metales. (Newman *et. al.*, 2002)

La presencia de altas concentraciones de metales pesados en el ambiente, ha tenido graves efectos sobre los ecosistemas y en la salud humana.

5.1.4 Contaminación por metales pesados en México

La contaminación por metales pesados no es un tema ajeno a México, por el contrario, es un asunto que requiere de inmediata atención.

La industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, practicada desde la época prehispánica y fuente de la expansión regional desde la Colonia. Ha estado presente en el desarrollo del país como un factor importante de modernización y avance, al suministrar insumos a prácticamente todas las industrias. Sin embargo, la falta de normatividad sobre sus residuos, ha generado por décadas una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país, originando un serio problema ambiental. Otra fuente importante de contaminación por metales pesados en México es la actividad industrial. Desde la Colonia, este tipo de actividades genera diversos

residuos peligrosos que, ante la falta de una regulación jurídica adecuada, que los identificara como tales, se dispusieron en sitios inadecuados como: terrenos aledaños a las plantas industriales, especialmente adquiridos para ese propósito; patios de las propias instalaciones industriales o bien, en barrancas, ríos, basureros, terrenos baldíos y cañadas, entre otros. Hasta 1999 se tenían identificados 105 sitios abandonados contaminados con residuos peligrosos en 17 estados. En estos sitios destaca la contaminación con metales pesados que ocupan el primer lugar (61 sitios) entre los residuos peligrosos encontrados, el plomo (Pb) es el elemento más común, presentándose en 23 de estos sitios. Los residuos biológico-infecciosos ocupan el segundo lugar (17.6%) y las escorias el tercero (13.5%), destacando las provenientes del sector del hierro y acero (Tabla 1).

Tabla 1. Principales residuos peligrosos encontrados en sitios contaminados en México

Tipo de residuo	Número de sitios	
	Total	%
Metales (Cr, Pb, Hg, Zn), As, cianuro, baterías automotrices gastadas	61	35.9
Biológico-infecciosos	30	17.6
Escorias de Fundición (Pb, Cd, As)	23	13.5
Grasas, aceites gastados	19	11.2
Solventes químicos	14	8.2
Químicos inorgánicos	12	7.1
Hidrocarburos	11	6.5

Origen: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/459/cap2.html>

Como puede verse, la contaminación de suelos por metales es un problema persistente en muchos sitios del territorio nacional. Los tres contaminantes más frecuentes en las zonas mineras del país son el arsénico (As), el plomo (Pb), y el cadmio (Cd). Estos elementos se encuentran comúnmente en residuos como jales mineros y escorias de fundición, cuyo volumen supera las 80,000 ton (y esta cantidad corresponde sólo a los sitios registrados, en los que se ha calculado el volumen) (SEMARNAT 2005).

Debido a que los metales pesados son elementos químicos y por lo tanto no pueden degradarse, los sitios contaminados por estas sustancias son notoriamente difíciles de remediar. Sin embargo, se ha observado e investigado la capacidad de algunas plantas de acumular metales pesados en sus órganos e incluso de transformarlos a formas químicas menos tóxicas (Cunningham *et. al.*, 1995; Chaney, 1997; Newman y Unger, 2002).

5.2 Remediación

El término remediación se refiere a todas aquellas técnicas o actividades que tienen como finalidad eliminar las sustancias contaminantes que han sido vertidas en un medio físico como el agua, el suelo o el aire; ya sea que se encuentre conservado de forma natural o modificado por el hombre (Saval, 1998).

Se aplican técnicas físicas, químicas y biológicas para la remediación de sitios contaminados. Los tratamientos fisicoquímicos utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado, para destruir, separar o contener la contaminación. Estas formas de remediación involucran métodos de contención tales como barreras físicas, encapsulación, vitrificación, así como separación física, excavación, lavado de suelo, electrorremediación, métodos térmicos y barreras activas. Sin embargo, estas tecnologías generalmente son excesivamente costosas, no específicas o tienen el potencial para introducir contaminantes secundarios. (Tabla 2) (Volke, 2002; Adriano *et. al.*, 2004; Singh *et. al.*, 2008). Es por esto que a la mitad de los años 70 del siglo pasado empezó a surgir una tecnología amigable con el ambiente, basada en los procesos de degradación biológica natural y por ende de menor costo. Esta tecnología recibió el nombre de Biorremediación (Litchfield, 2005; Singh *et. al.*, 2008).

Tabla 2. Oferta de tecnologías de remediación y costos

Tecnología	Descripción	Aplicación	Costo (\$US/ton)
De contención			
Física	Impide el movimiento del flujo.	Capas de tierra	10-90
Encapsulación	Creación de un desecho inerte	Inyección de químicos solidificantes	60-290
Vitrificación	Aplicación de energía eléctrica para vitrificar el contaminante	Suelos superficiales contaminados por metales, metales con baja volatilidad.	400-870
Tratamiento <i>Ex situ</i>			
Separación física	Incluye, espuma de flotación, separación por gravedad, etc.	Para altas concentraciones de metales.	60-245
Lavado de suelo	Adición de surfactantes y otros aditivos para solubilizar	Para contaminantes solubles en agua	25-300
Pirometalurgia	Extracción y procesamiento a elevadas temperaturas para remoción de metales	Suelos altamente contaminados (5-20%)	200-1000
<i>In situ</i>			
Barreras reactivas	Creación de barreras permeables	Absorción o degradación de contaminantes en barrera	60-245
Irrigación de suelo	Irrigación de agua para filtrar contaminantes	Para contaminantes solubles	100-200
Electrocinética	Aplicación de corriente eléctrica	Aplicable en suelos saturados con bajo flujo de agua	Poca información
Fitorremediación	Uso de plantas en la extracción de metales	Suelos y aguas superficiales	Buena (50,000-200,000/4500 Ton)

Origen: Mulligan et al, 2001.

5.3 Biorremediación

La biorremediación es la aplicación ingenieril de procesos biológicos para la remediación de suelos y cuerpos de agua contaminados. Se basa en sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias, principalmente) para degradar, transformar o remover compuestos y elementos tóxicos del ambiente. Los procesos bioquímicos que ocurren durante el proceso de biorremediación incluyen: reacciones de oxido-reducción, procesos de absorción e intercambio iónico, y reacciones de acomplejamiento y quelación de metales. Estas reacciones toman lugar como parte de los procesos metabólicos que los organismos llevan a cabo naturalmente y que la biorremediación aprovecha en una amplia gama de estrategias de remediación de acuerdo con los requerimientos del sitio en particular y del contaminante (Sturman *et. al.*, 1995; Vidali, 2001; Volke y Velasco, 2002; Singh, 2008).

La aplicación de métodos de biorremediación tales como, bioventeo (estimulación de la degradación natural en condiciones aerobias); composteo (tratamiento de suelo y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, para obtener productos inocuos estables); bioaumentación (adición de microorganismos con capacidad degradadora del contaminante, en caso de que no existan naturalmente en el lugar); bioestimulación (adición de nutrientes para incrementar la biomasa autóctona); biolabranza (tratamiento del suelo contaminado por medio del arado); biopilas (sistema aeróbico, para extensas áreas de suelo contaminado, al cual se le adicionan nutrientes, agua y agentes de volumen); biorreactores (degradación de contaminantes por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida) y fitorremediación (uso de plantas para remediar sitios contaminados), es atractiva porque tiene potencial para (1) la eliminación de contaminantes a través de la transformación bioquímica o mineralización; (2) evita severos tratamientos fisicoquímicos; (3) pueden ser operados *in situ*; y (4) presentan bajo costo efectivo. La biorremediación además reduce los riesgos por exposición de personal involucrado en la limpieza del sitio, permite su recuperación como ecosistema y está basada en la atenuación natural, características por la cuales

es públicamente considerada más aceptable que otras tecnologías (Sturman, 1995; Vidali, 2001).

5.4 Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología emergente que hace referencia al uso de las plantas y microbiota asociada a la rizósfera, para remover, contener o transformar los contaminantes del ambiente. Esta tecnología se basa en la capacidad natural de las plantas de degradar, transformar y acumular tanto nutrientes esenciales, como no esenciales en sus raíces y partes aéreas como tallos y hojas (Cunningham *et. al*, 1995; Ritman y Macarty, 2001; Vidali, 2001; Prasad, 2003; Eapen y D'Souza, 2005; Kramer, 2005; Scullion, 2006).

Las técnicas de fitorremediación se pueden dividir en seis procesos: (Vidali 2001; Khan *et. al.*, 2004):

Fitoextracción o fitoacumulación. Uso de las plantas para absorber contaminantes desde el suelo por medio de sus raíces. Eventualmente estos contaminantes son translocados hacia las partes aéreas de las plantas y concentrados en tallos y hojas. La fitoextracción es frecuentemente usada para la recuperación de metales pesados.

Fitotransformación o fitodegradación. Se refiere a la toma de contaminantes por parte de la planta desde el suelo, sedimento o agua y a su subsecuente transformación a formas menos tóxicas. Esta opción resulta útil especialmente para los contaminantes orgánicos.

Fitoestabilización. Técnica por la cual las plantas reducen la movilidad y migración de los contaminantes en el suelo.

Rizodegradación. Es la ruptura de los contaminantes a través de la actividad existente en la rizosfera. Esta actividad es estimulada por la presencia de proteínas y enzimas excretadas por las raíces de las plantas,

las cuales proporcionan los nutrientes necesarios para la microbiota asociada.

Rizofiltración. Es una técnica para la remediación de agua que involucra la toma de los contaminantes por las raíces de las plantas. Es usada también para reducir los contaminantes en suelos húmedos y en estuarios.

Fitovolatilización. Técnica que hace referencia al uso de las plantas para la volatilización desde el suelo a través de sus raíces y tallos para convertir ciertos metales en una forma volátil y su posterior liberación por la vía de transpiración de las plantas (Ritman y Macarty, 2001; Prasad, 2003; LeDuc y Terry, 2005).

Las características con las que debe contar una planta para ser considerada en la aplicación de las técnicas de fitorremediación, son las siguientes (Clemens *et. al.*, 2002; Eapen y D'Souza, 2005 y Scullion, 2006).

- 1) Habilidad para acumular contaminantes preferentemente en sus partes aéreas
- 2) Tolerancia para la concentración de metales
- 3) Rápido crecimiento y gran biomasa
- 4) Extenso sistema radicular
- 5) Fácil de cultivar

5.4.1 Remediación por helechos

La búsqueda de plantas hiperacumuladas de metales se ha enfocado en las angiospermas, principalmente en las familias fácilmente cultivables, sin embargo en los últimos años la búsqueda de plantas con características fitorremediadoras se ha ampliado y ahora también abarca a las pteridofitas. Los helechos son un grupo de plantas que tiene un amplio potencial para la remoción de metales pesados del ambiente. El primer helecho reportado como hiperacumulador fue *Pteris vittata* para As, esta especie ha sido la más estudiada y también ha sido reportada para U, Cr y Se, además el género al que pertenece es el más explorado, aunque también se han reportado otros géneros, tales como

Blechnum hiperacumulador de Zn, *Dennstaedtia* (Cd, Cu); *Dicranopteris*, *Elaphoglossum*, *Lycopodium*, *Sticherus* y *Nephrolepis*, acumuladores de Al; *Asplenium*, *Ceratopteris*, *Polystichum*, *Pityrogramma*, *Salvinia* y *Thelypteris* para As; *Pallae* (Cr); *Doodia* (Ni) y *Azolla* (Cs, Sr, Hg II, Cr) por mencionar solo algunos (Ma *et. al.*, 2001; Francesconi *et. al.*, 2002; Wei y Chen 2006; Rathinasabapathi *et. al.*, 2006; Anderson y Walsh, 2007; Kachenko *et. al.*, 2007; Olivares *et. al.*, 2008; Rahman *et. al.*, 2008; Zhang *et. al.*, 2008).

5.5 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas que al aprovechar la totipotencialidad celular de las plantas hacen posible la división de un organismo en sus bloques constituyentes y el cultivo *in vitro* y aséptico de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas, en condiciones controladas (medio nutritivo, pH, luz, temperatura, atmósfera, etc.), permitiendo al investigador llegar a dirigir las respuestas morfogénéticas y biosintéticas de las células vegetales (Chávez, 1993).

El cultivo de tejidos vegetales se basa en tres principios básicos, de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos son los siguientes: (Roca y Mroginski, 1991).

1. Tejido joven (explante). Por regla general, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*. Así mismo, el tipo de explante que se elija será determinante para la obtención de la respuesta deseada.
2. Medio de cultivo adecuado. La elección y adecuada formulación del medio de cultivo son uno de los aspectos fundamentales, ya que las sustancias que los componen influyen en el éxito o fracaso del establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro*.
3. Lograr condiciones asépticas. Para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo, cualquier tipo de organismo contaminante.

Estos tres principios son la base para que el cultivo de tejidos vegetales incida directamente en: (Chávez, 1993).

- Investigación básica
- Biosíntesis y modificación de sustancias naturales en las células cultivadas
- Mejoramiento genético
- Conservación de germoplasma
- Micropropagación

5.6 Micropropagación

Se le llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Ésta es una de las aplicaciones más utilizadas de entre todas las técnicas que componen la llamada biotecnología vegetal, ello se debe a su enorme productividad al comparársele con las técnicas tradicionales de propagación de plantas (Perez *et. al.*, 1999).

La micropropagación de cualquier especie vegetal consta de cinco etapas básicas, cada una de ellas fundamental para el éxito del sistema (Roca y Mroginski, 1991; Razdan 2003; George *et. al.*, 2008).

ETAPA 0. SELECCIÓN DE LAS PLANTAS MADRE

Se trata de una etapa preparativa, en la cual se selecciona a la planta madre. Esta debe contar con las características deseadas y estar en buen estado, ya que la calidad de las plantas donadoras, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético, es importante para que el desarrollo de la micropropagación sea eficiente y repetible. Así mismo, en esta etapa se lleva a cabo la identificación taxonómica de la especie que se desea micropropagar.

ETAPA 1. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS AXÉNICOS

Esta etapa consiste básicamente en la elección del explante y la esterilización del mismo para iniciar un cultivo axénico. Dentro de ésta, se consideran todas

aquellas acciones para reducir el nivel de contaminación, generada por la presencia de hongos, levaduras o bacterias en los explantes, por lo que el uso de agentes desinfectantes tales como hipoclorito de sodio (NaOCl), alcohol (OH), hipoclorito de calcio (CaOCl) peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y/o detergentes como el Tween es altamente recomendable.

ETAPA 2. MULTIPLICACIÓN DEL TEJIDO

Es en esta etapa donde se realiza verdaderamente la micropropagación, obteniéndose un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido. Para esto, los explantes se colocan en un medio de multiplicación adecuado, es decir que contenga los nutrientes necesarios para la regeneración de nuevos brotes.

Por lo general, los brotes obtenidos en esta etapa son pequeños, carecen de raíz y tienen poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas.

ETAPA 3. ELONGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO

Lo que se pretende en esta etapa es que los brotes formen su sistema radical al mismo tiempo de estimular su elongación, para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas. El enraizamiento se puede lograr separando los brotes y transfiriéndolos a un medio de cultivo apropiado.

ETAPA 4. ADAPTACIÓN AL MEDIO AMBIENTE

Las plantas generadas *in vitro* presentan características peculiares, tales como tasas reducidas en la fotosíntesis, cutícula delgada y régimen de evapotranspiración ineficiente, que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el período de cultivo. En este proceso de aclimatización, la planta generada *in vitro* deja de ser heterótrofa y pasa a ser autótrofa, por lo que esta

última etapa de la micropropagación es crucial para la obtención de plántulas totalmente autótrofas a través de un sistema *in vitro*.

5.6.1 Ventajas de la micropropagación

Las principales ventajas que ofrece la micropropagación son las siguientes (Collin y Edwards 1998; Pérez 1999; Razdan, 2003; George *et. al.*, 2008).

- Se trata de un sistema de propagación clonal, es decir que mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado.
- Debido a esto es un sistema ideal para la multiplicación masiva de plantas o variedades con características sobresalientes.
- Se trata de un sistema totalmente independiente de las condiciones externas por lo que no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales.
- El número de plantas que se puede obtener mediante micropropagación es por su naturaleza prácticamente ilimitado.
- El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto.
- Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides.

Así mismo la micropropagación permite emplear técnicas de selección y mejoramiento de las características favorables de las plantas por medio de selección clonal. Las características que pueden mejorarse cubren un amplio rango de posibilidades; por ejemplo, la resistencia de las plantas a la temperatura, a la sequía, a crecer en suelos pobres o con características desfavorables, como acidez o alcalinidad excesiva, salinidad alta o saturación de humedad o en sitios altamente contaminados; también puede mejorarse el rendimiento del forraje y frutos, su sabor y calidad nutricional, la velocidad de crecimiento, la calidad de la madera producida y la concentración de compuestos secundarios valiosos como sustancias químicas, látex y gomas (Castillo, 2004).

5.6.2 Desventajas de la micropropagación

- Costo inicial del laboratorio.
- Personal con un nivel alto de capacitación.
- Factores que obstaculizan el desarrollo de los tejidos cultivados tales como:

Hiperhidratación. También conocida como vitrificación, es un desorden morfológico y fisiológico que se presenta en plantas propagadas *in vitro*. Estas plantas se caracterizan por tener una apariencia vidriosa originada a partir de factores como alta disponibilidad de agua, alto contenido de nutrientes y desbalance hormonal en el medio. Estas plantas también presentan bajos niveles de lignina, celulosa, pectinas y cutinas, así como de depósitos de calosa, y está asociada a estomas morfológicamente anormales.

Variación somaclonal. Se refiere a las anomalías morfológicas que presentan las plantas y que son el resultado de una variación genética producida durante el cultivo *in vitro*.

- Oxidación fenólica. Los compuestos fenólicos son producidos por las plantas en respuesta al estrés. Muchos de estos compuestos son fitotóxicos y pueden llevar a la muerte del explante. Cuando se da este fenómeno el explante se caracteriza por la aparición de la coloración negra o marrón (Collin y Edwards 1998; Perez *et. al.*, 1999; Razdan, 2003; Hazarika 2006, George *et. al.*, 2008).

5.6.3 Respuesta morfogenética

La respuesta de un tejido en cultivo *in vitro* depende de la interacción entre el explante, el medio y las condiciones de cultivo. Esta respuesta se puede dar vía organogénesis o vía embriogénesis somática (formación de embriones a partir de células somáticas) (Collin y Edwars, 1998); Perez *et. al* 1999).

5.6.3.1 Organogénesis

La organogénesis es la formación de *novo* de órganos adventicios como raíces y brotes a partir de un explante. Este proceso morfogénico se caracteriza por su desarrollo unipolar y, a que su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen (Chávez, 1993, Chawla, 2002).

La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien, indirecta cuando en primer lugar se origina tejido calloso y luego se originan los órganos a partir de éste (Perez et. al, 1999; Chawla, 2002; Phillips, 2004).

En general son reconocidas tres fases en el proceso organogénico. En la primera fase las células en el explante adquieren “competencia”, la cual es definida como la habilidad para responder a señales hormonales del parte del órgano en inducción. A este proceso de adquisición de competencia organogénica también se le refiere como desdiferenciación. Durante la segunda fase, las células competentes del explante en cultivo son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano en específico, debido a la influencia del balance de fitohormonas en el medio, y finalmente en la tercera fase el proceso morfogénico se desarrolla independientemente de la aplicación exógena de fitohormonas (Sugiyama, 1999).

5.6.4 Reguladores de crecimiento vegetal

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos. Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados reguladores del crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas (Pérez et. al., 1999).

Los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta. Estas sustancias se han extraído o producido sintéticamente para su aplicación exógena en el medio de cultivo con el fin de controlar la respuesta morfogénica

del tejido en técnicas de cultivo *in vitro*. El manejo adecuado de los RCV en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema (Roca y Mroginski, 1991; George *et. al*, 2008).

Las fitohormonas se clasifican en 5 grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Los reguladores de crecimiento vegetal más utilizados en el cultivo *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, ya que estos regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo organizado en las plantas (Perez *et. al.*, 1999).

5.6.4.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos derivados comúnmente del triptófano, y que están implicados en varios eventos relacionados con el crecimiento y diferenciación celular. En las plantas completas las auxinas también tienen que ver con la dominancia apical, afectan la senescencia y abscisión de las hojas y coordinan algunas respuestas trópicas. Así mismo se sabe que en procesos de cultivo *in vitro*, estas fitohormonas participan en la regulación del crecimiento celular, el inicio de la división celular, la formación de tejidos no diferenciados (tejido calloso), la diferenciación del tejido vascular y la formación de órganos (raíces) (Collin y Edwards, 1998; Perez *et. al*, 1999; Chawla, 2002; George *et. al*, 2008).

Las auxinas son sintetizadas en regiones meristemáticas y órganos jóvenes en crecimiento. La auxina natural más común es el ácido indolacético (AIA), pero dependiendo de la especie, edad de la planta, estación del año y condiciones de crecimiento pueden aparecer otras auxinas naturales en los tejidos, como por ejemplo, el ácido 4-cloroindol-3-acético, el ácido indol-3-acrílico o el ácido indolbutírico (AIB) (George *et. al*, 2008).

El AIA y el AIB se utilizan frecuentemente en los medios de cultivo. Por ser compuestos que se encuentran naturalmente en la planta, tienden a ser metabolizados por los tejidos; pero éstos se desnaturalizan con relativa rapidez en el medio, provocando que la disponibilidad real de estas auxinas en el medio

de cultivo disminuya paulatinamente. Actualmente se conocen y utilizan varios compuestos sintéticos que tienen una fuerte actividad de auxinas y son más estables en el medio. Entre estos compuestos artificiales encontramos al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (Picloram) (Collin y Edwards, 1998; Perez *et. al*, 1999; Chawla, 2002; Razdan, 2003; George *et. al*, 2008).

5.6.4.2 Citocininas

Las citocininas generalmente son derivados de adenina. En las plantas completas, promueven la brotación de yemas axilares, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia. Para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales poseen dos propiedades que las hacen muy útiles; por un lado estimulan la división celular y por otro rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar. Junto con las auxinas, las citocininas, regulan la división celular (Chawla, 2002; George *et al.*, 2008).

Estos reguladores de crecimiento son sintetizados en tejidos jóvenes y raíces. Las citocininas naturales más comunes son la zeatina, la isopentiladenina (2iP) y el ribósido de zeatina. Las citocininas sintéticas benciladenina (BAP) y cinetina son las más utilizadas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Algunos herbicidas sintéticos como las fenilureas tienen actividad de citocinina (Kn) en bajas concentraciones. Un ejemplo de esto último es el N-fenil-N'-1,2,3-tidiazolil-5-urea (Thidiazurón=TDZ) (Perez *et al* 1999; Chawla, 2002; George *et. al*, 2008).

5.7 Cultivo *in vitro* en helechos

El uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales en helechos comenzó con el cultivo de esporas en substratos artificiales, en un principio en condiciones parcialmente estériles, como bancos de arena esterilizada y posteriormente sobre condiciones estériles en cajas petri con agar (Fernández y Revilla, 2003).

El cultivo *in vitro* en helechos se ha empleado para desarrollar gametofitos, estudios de germinación de esporas; formación del esporofito mediante

reproducción sexual —germinación de esporas y subsecuente fecundación— o a través de la reproducción asexual—obtención de esporofitos desde células gametofíticas, sin la intervención de gametos (apogamia)—; morfogénesis en esporofitos jóvenes—obtención de gametofitos a partir de esporofito (aposporía), y posterior obtención de esporofitos—; y regeneración de esporofitos a partir de esporofitos de manera directa (Fernández y Revilla, 2003; Somer *et. al*, 2010).

Estos métodos de propagación *in vitro* de helechos son usados principalmente con el fin de propagar plantas ornamentales, tales como *Nephrolepis*, género perteneciente a las pteridofitas, más propagado por cultivo *in vitro*. Sin embargo, las vías de desarrollo *in vitro* de gametofitos o esporofitos a partir de un explante permanece poco explorada en helechos (Hegde *et. al.*, 2006).

5.8 *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn

Pteridium aquilinum es un helecho perteneciente a la familia Dennstaedtiaceae, también conocido como helecho macho o de potrero. Se caracteriza por tener un rizoma largamente rastrero, peloso, subterráneo; hojas de 1-2 m, monomorfas y un pecíolo ocasionalmente con yemas epipeciolares cerca de la base; lámina hasta 4-pinnada, pelosa o glabra, sin yemas en las axilas de las pinnas distales; pinnas ocasionalmente con nectarios oscurecidos en sus axilas; nervaduras libres, bifurcadas; soros marginales continuos, excepto en los senos, dispuestos a lo largo de una nervadura comisural que une los ápices de las nervaduras; indusio doble, el adaxial formado por el margen recurvado, el abaxial inconspicuo, hialino, aparentemente no siempre presente; esporas triletes (Morán y Riba, 1995).

P. aquilinum es un helecho cosmopolita, que suele tener predilección por suelos ácidos y regiones montañosas, pero puede persistir en un amplio rango de condiciones ambientales, debido a su habilidad de almacenar una gran cantidad de recursos en sus rizomas, a su rápida producción de frondas en primavera y al desarrollo de un dosel denso. No se ve afectado por el ganado, la herbivoría, ni otros patógenos y tiene propiedades alelopáticas (Marrs y Watt, 2006).

El crecimiento de *Pteridium aquilinum* se ha reportado en lugares contaminados por radionucleótidos (Sr y Cs) y metales pesados (Ar, Cd, Pl y Cr) (Tyson *et. al.*, 1999^a; Tyson *et. al.*, 1999^b; Chang *et. al.*, 2005; Anawar *et. al.*, 2006; Barriada *et. al.*, 2009). Además, Eslava (2009) reportó que las esporas de *P. aquilinum* germinan hasta 200 μm de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{C}_7$ y resisten hasta 800 μm en esporofito. Así mismo, se registró que este helecho acumuló en promedio $4128.64 + 3018.52 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en raíz-rizoma, a un riego continuo de 800 μm de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{C}_7$ durante dos semanas.

Este helecho, al igual que todas las plantas, cuenta con un ciclo de vida que se lleva a cabo en dos fases, la fase gametofítica (n), en donde se forman los gametos femeninos (ovocélula) y los masculinos (anterozoides), quienes llevarán

a cabo la fecundación y formanran al embrión dando lugar a la fase esporofítica ($2n$), en donde se producen las esporas (n) mediante un proceso meiótico y dando paso nuevamente a la fase gametofítica.

Así mismo se sabe que los helechos cuentan en su ciclo de vida con vías alternas de reproducción: la apogamia, que es el desarrollo de esporofitos directamente del gametofito sin la fusión sexual de los gametos y la aposporia la cual se define como el proceso morfogénético que involucra la generación de gametofitos desde tejido esporofítico en ausencia de meiosis o esporulación. (Raghavan, 1989)

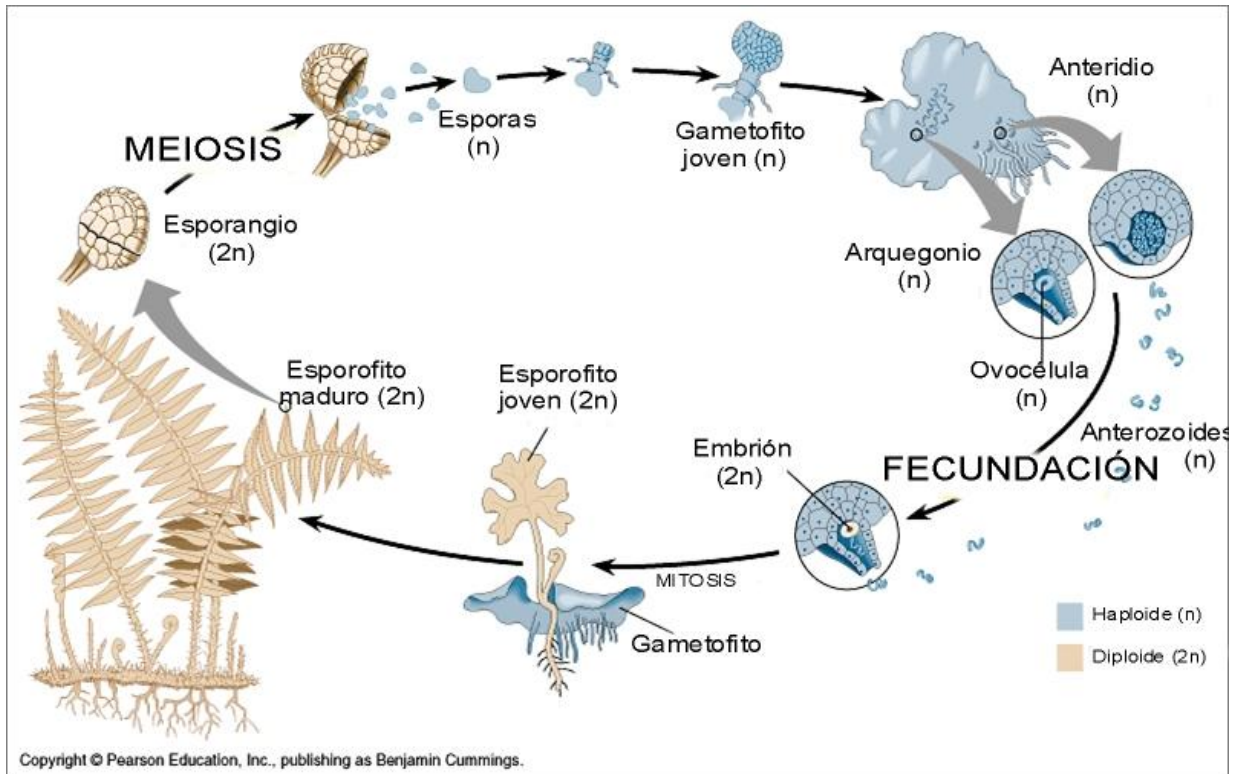


Figura 1. Ciclo de vida de helechos.

6 JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta biotecnológica aplicada exitosamente en la selección y manipulación genética de plantas para su mejoramiento, por lo que es necesario el uso de esta biotecnología para la producción exitosa de plantas con potencial fitorremediador.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo general:

- Desarrollar un método de micropropagación de *Pteridium aquilinum*.

7.2 Objetivos particulares:

- Estandarizar métodos de germinación de esporas.
- Probar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en los órganos de la planta.
- Optimizar el proceso de desarrollo *in vitro* del gametofito.
- Optimizar el proceso de desarrollo *in vitro* del esporofito.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Estrategia desarrollada

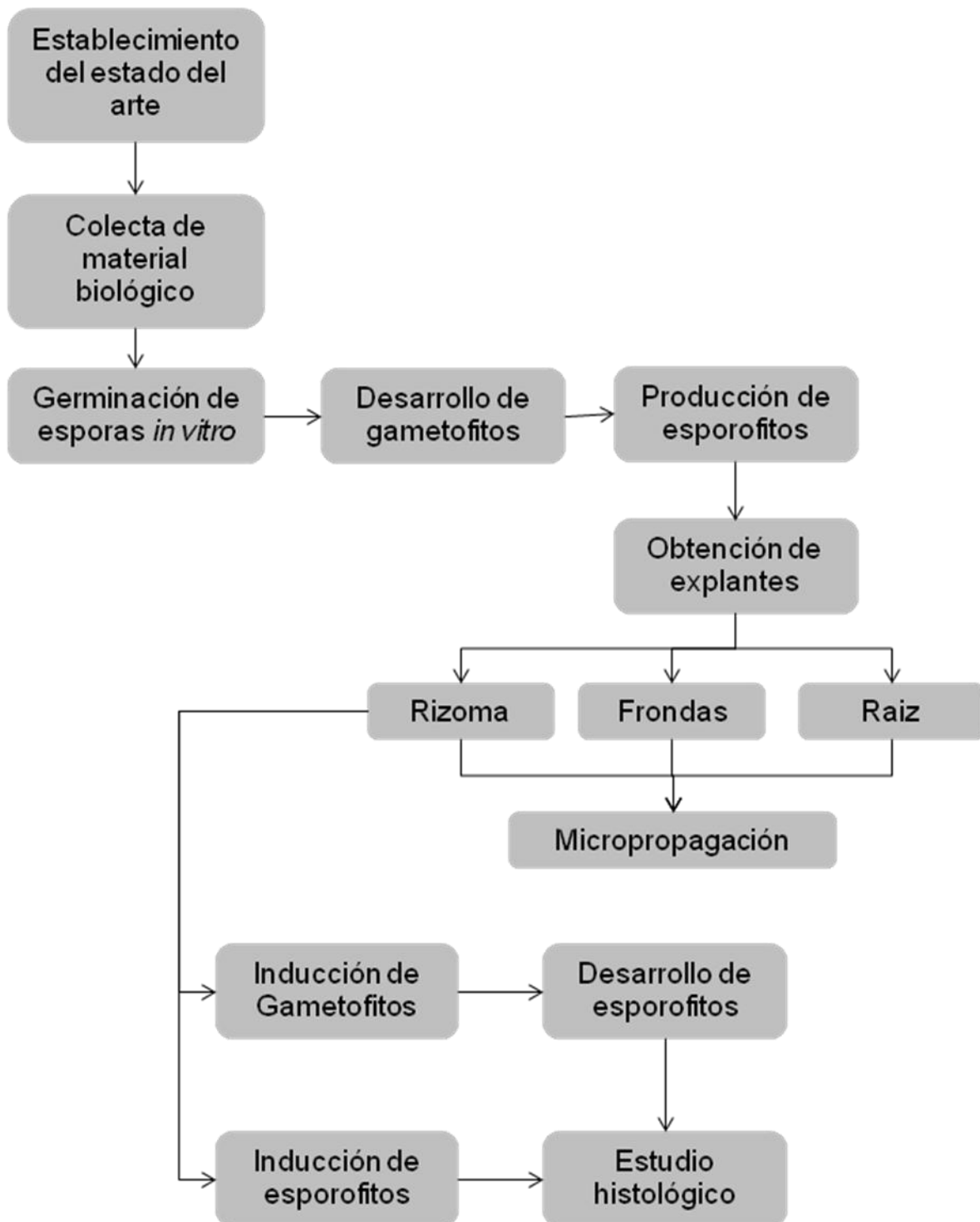
El estudio se dividió en tres etapas: de gabinete, de campo y de laboratorio.

Estudio de gabinete. Se determinó el estado del arte, el problema que se deseaba tratar y las especies tentativas a trabajar.

Trabajo de campo. Se realizaron visitas a lugares contaminados. Se determinó la especie a tratar de acuerdo a su abundancia en el sitio de interés, *Pteridium aquilinum*, y se colectaron esporas.

Trabajo de laboratorio. Se llevó a cabo la propagación de la especie en condiciones *in vitro*, germinación de esporas y obtención de gametofitos y esporofitos en condiciones estériles. Se probó la respuesta de diferentes explantes del esporofito, a diferentes concentraciones de hormonas vegetales, tanto auxinas como citocininas y se determinó el mejor tratamiento de micropropagación. Se realizó un análisis histológico para identificar zonas meristemáticas en las plantas cultivadas *in vitro* y estructuras anatómicas típicas en las plantas obtenidas a partir de la micropropagación, estableciéndose así las bases para iniciar procesos de mejoramiento *in vitro*. Cuadro 1.

Cuatro 1. Estrategia a desarrollar.



8.2 Material biológico

Se colectaron esporas de *Pteridium aquilinum* en la localidad “La cantera” (latitud 20° 39' 54.3" N, longitud 98° 89' 56.2" W, altitud 2036.), Zacualtipán, Hidalgo, en febrero de 2006. Las esporas se desecaron a temperatura ambiente y se tamizaron de acuerdo con el procedimiento de Muñiz (2008) y se mantuvieron a 4°C.

8.3 Medio de cultivo

Para el establecimiento de cultivos *in vitro* y los experimentos de micropropagación se utilizó el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962). En los diferentes experimentos se emplearon concentraciones distintas de los macronutrientes de este medio, de sacarosa y de los reguladores de crecimiento. En todos los casos el pH del medio se ajustó a 5.7 con KOH 1N y HCl 1N. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 120° C.

8.4 Desinfección de esporas

Para obtener material vegetal aséptico, para su posterior utilización en experimentos de micropropagación, se colocaron 25 mg de esporas en un microtubo de 1.5 mL, con 1.5 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 0.3%; el microtubo permaneció en agitación 2 minutos y posteriormente se centrífugo durante 1 minuto a 14000 rpm. El sobrenadante con las esporas suspendidas se filtraron con papel filtro estéril. La esporas se enjuagaron tres veces con 5 mL de agua destilada estéril y se resuspendieron en 5 mL de agua destilada estéril. Se inocularon 250 µL de la suspensión de esporas de *P. aquilinum* en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con 25 mL de medio de cultivo ½ MS (diluido a la mitad).

8.5 Germinación

Las cajas Petri con las esporas se pusieron en una germinadora. Las condiciones que se mantuvieron durante el periodo de germinación fueron 25°C con un fotoperiodo de 16hrs luz/8hrs oscuridad hasta la formación del esporofito.

8.6 Desarrollo del esporofito

Se obtuvieron gametófitos maduros a los 17 días de siembra, los cuales se transplantaron a medio fresco MS y se regaron con 1 mL de agua destilada estéril dos veces a la semana, hasta la aparición de los esporofitos. Posteriormente, se aplicó el tratamiento de enraizamiento.

8.7 Rizogénesis

Con el fin de estimular el desarrollo de raíces y rizoma, los esporofitos se subcultivaron en medio de cultivo MS modificado (con la mitad de macronutrientes), en las condiciones antes descritas, hasta el desarrollo de raíces y rizomas abundantes.

Cuando se obtuvo la cantidad suficiente de esporofitos jóvenes (35 individuos) se iniciaron los experimentos de micropropagación

8.8 Micropropagación

Empleando plantas de *Pteridium aquilinum* cultivadas *in vitro*, de 3 meses de edad (obtenidas con el método descrito anteriormente), se efectuó un primer experimento para probar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la raíz y el rizoma de la plantas.

Fueron sembrados 3 explantes de 1.0 cm, en frascos de vidrio de 125 mL que contenían 25 mL de medio MS completo, adicionado con 30 g/L de sacarosa 8 g/L de agar y diferentes concentraciones de 5 reguladores de crecimiento en tres concentraciones diferentes (Tabla 3). Se probaron 15 tratamientos. La unidad experimental fue el explante y se hicieron 15 repeticiones por tratamiento. La respuesta se evaluó a los 40 días por la presencia o ausencia de brotes de gametófitos o esporofitos.

Tabla 3. Concentraciones de reguladores de crecimiento empleados para el cultivo *in vitro* de los explantes de *P. aquilinum* en medio MS.

Hormona	Concentración mg/L
Citocininas	
Cinetina	0.5, 1, 2
BAP	0.5, 1, 2
Thidiazurón	0.05, 0.1, 0.2
Auxinas	
ANA	0.5, 1, 2
2-4-D	0.5, 1, 2

Posteriormente se efectuó un segundo experimento en el cual se probó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre las frondas, la raíz y el rizoma de la plantas.

Para este experimento fueron sembrados 3 explantes de 1.0 cm, en frascos de vidrio de 125 mL que contenían 25 mL de medio MS completo, adicionado con 30 g/L de sacarosa, 8 g/L de agar y diferentes concentraciones de 5 reguladores de crecimiento (en las mismas concentraciones que en el primer experimento). La unidad experimental fue el explante y se hicieron 15 repeticiones por tratamiento. La respuesta se evaluó a los 40 días considerando el porcentaje de respuesta por tratamiento, la biomasa seca de gametófitos y el número de esporofitos por explante.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa GraphPad versión 5.0 mediante Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey.

8.9 Aclimatización

Los esporofitos enraizados fueron llevados a condiciones *ex vitro*. Se sacaron de los frascos y se lavaron las raíces y rizoma con agua destilada para eliminar los restos de agar y se subcultivaron en recipientes de unicel con tierra y agrolita 1:1.

Las plantas se aclimatizaron por reducción gradual de humedad en condiciones de invernadero.

8.10 Análisis histológico

Se tomaron muestras de frondas y rizoma para identificar estructuras anatómicas típicas en las plantas obtenidas a partir de la micropropagación.

Los tejidos de rizoma se fijaron en FAA durante 48 hrs. Se deshidrataron por inmersión, durante 30 minutos, en concentraciones ascendentes de alcohol etílico (30%, 50%, 70%, 85%, y 96%). A continuación permanecieron durante 10 minutos en alcohol absoluto. Posteriormente se pasaron a una mezcla de etanol absoluto-xilol 1:1 durante 2 minutos; Después las muestras se incluyeron en parafina por inmersión en soluciones de xilol-parafina con concentraciones ascendentes de parafina, en proporciones 2:1, 1:1 y 1:2 durante 2 min., 30 min. y 48 hrs. respectivamente. En este último paso, las muestras permanecieron a una temperatura de 75°C. Las muestras incluidas en parafina, se colocaron y orientaron en cubos de metal con una base de madera, llenos con parafina líquida. La parafina se dejó enfriar y una vez obtenidos los bloques sólidos con la muestra, se le dio forma de pirámide a la parafina con ayuda de una navaja. Después los bloques se refrigeraron por 10 min. Se obtuvieron cortes de 8 µm, con ayuda de un micrótopo semiautomático marca Leica.

Los cortes se tiñeron mediante la técnica de tinción doble safranina (metilcelosolve)–verde rápido (metilcelosolve). Los cortes se desparafinaron en una estufa durante 30 min, posteriormente se sumergieron en xilol durante 20 min. y se pasaron a una mezcla de xilol- alcohol absoluto 1:1 por 10 min. Más tarde se hidrataron en una serie etanólica hasta 96% y se tiñeron con safranina durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo los cortes se enjuagaron con agua destilada (no directamente sobre el corte) y se les aplicó una mezcla de etanol al 96% más ácido pícrico. Después se enjuagaron con etanol al 96% más amoníaco para detener la acción del ácido pícrico y se deshidrataron en etanol absoluto durante 10 seg; los cortes se volvieron a teñir, ahora con verde rápido para contrastar. Se lavaron con aceite de clavo para sacar el exceso de colorante y se

aclararon con una mezcla de aceite de clavo, xilol y etanol absoluto. Finalmente, los cortes se enjuagaron con xilol y se montaron en bálsamo de Canadá.

Para la observación de las frondas se realizó aclarado. Las frondas se colocaron en un recipiente de vidrio con una solución de hidróxido sódico en hipoclorito de sodio al 0.3% (5g/100ml) y se colocaron al sol hasta que las pinas presentaron una tonalidad blanquecina-transparente. Posteriormente se deshidrataron en una serie etanólica (30%, 50%, 70%, 85%, y 96%) durante 30 min. en cada alcohol. Finalmente, se tiñeron con safranina y se montaron en bálsamo de Canadá.

Las preparaciones obtenidas de los cortes de rizoma y los aclarados de fronda se observaron al microscopio óptico a 5x, 10x y 40x y se fotografiaron.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1 Obtención de material aséptico

Los reportes de cultivo *in vitro* de helechos son abundantes, aunque en realidad se trata de estudios de germinación de esporas en condiciones estériles o de estudios botánicos y/o fisiológicos para identificar particularidades en el proceso de desarrollo de la planta. En cambio, hay muy pocos reportes disponibles en la literatura acerca de la micropropagación de helechos (Hedge, 2006).

La obtención de sistemas eficientes de reproducción en condiciones estériles y controladas, tanto de gametofitos como de esporofitos, que haga disponibles explantes suficientes para los ensayos de micropropagación ha sido tal vez la principal limitante para la micropropagación de helechos. En el presente estudio se empleó un sistema muy eficiente de generación *in vitro* de esporofitos de *P. aquilinum* (Eslava, 2009), lo cual presentó una ventaja experimental muy clara al obtener material aséptico que permitió establecer un sistema de micropropagación libre de contaminantes.

9.2 Micropropagación

9.2.1 Raíz y fronda

Las raíces y las frondas de *P. aquilinum* no resultaron buenos explantes. Cuando se utilizaron frondas los tejidos se oxidaron siempre, mientras que el empleo de explantes de raíz generó como respuesta la formación de más raíces, ante la presencia de cualquiera de los reguladores de crecimiento utilizados. El único explante que resultó útil para obtener respuestas morfogénicas en *Pteridium aquilinum* fue el rizoma. A partir del rizoma se generaron tanto gametofitos como esporofitos (Tabla 4).

Tabla 4. Respuesta del explante

Explante	Gametofito	Esporofito
Rizoma	✓	✓
Raíz	×	×
Hoja	×	×

Parece ser que la capacidad morfogénica sólo del rizoma es una condición particular de *Pteridium aquilinum*, porque hay reportes en la literatura en los que se generaron respuestas positivas a partir de frondas (en 3 ocasiones) y en un reporte se utilizó raíz como explante.

En general, la raíz parece tener poco potencial para el desarrollo de gametofitos. El empleo de citocininas solas, en particular BAP, para estimular el desarrollo de gametofitos a partir de la raíz es poco eficiente. En el trabajo realizado por Bertrand *et. al.*, 1999, donde se investigó la organogénesis de *Polypodium cambricum* a partir de diferentes explantes, se reportó que no hubo respuesta utilizando raíz como explante en medio de cultivo suplementado con BAP. La presencia de auxinas mejora la respuesta. La combinación de BAP con ANA, sin embargo, produjo gametofitos de forma escasa (no hubo diferencias significativas en relación con la utilización exclusiva de BAP).

Las frondas parecen ser un explante más adecuado. El mismo autor reporta la formación de cuerpos globulares verdes (GGB, por su siglas en inglés), a partir de fronda en medio de inducción con 2.5 µM y 5.0 µM de BAP y con 10 µM fue inhibitorio. Así mismo registra la formación de gametofitos con 2.5 µM y 5.0 µM de BAP en combinación con 0.57 µM de ANA. Sin embargo no se presentaron diferencias significativas, por lo que de igual manera podemos establecer que se obtuvo un resultado similar cuando se probó fronda en medio con BAP.

Por otro lado, Yoshihara *et. al.*, (2005), probó en total 18 combinaciones de cinetina (0.0, 0.5 y 1.0 mg/L) y 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/L), usando como explante peciolo de la fronda o fronda para la inducción de callo para *Athyrium yokoscence*. Ninguna de estas combinaciones resultó en la formación directa de callo ni se reporta ninguna otra respuesta. De acuerdo con este

reporte, callo embriogénico sólo fue inducido vía generación de prótalo desde esporas. De los callos inducidos se obtuvieron esporofitos. A pesar de que en este estudio se reporta la formación de callo embriogénico, no queda claro este hecho en sí, ya que se menciona que el callo fue inducido por medio de prótalo desde esporas, por lo que, lo que los autores consideran callo podría ser en realidad gametofitos que se obtuvieron vía germinación de esporas.

La edad del tejido puede ser importante cuando se utilizan frondas como explantes. En el 2006 Martin *et. al.*, reportaron la obtención de gametofitos apospóricos para *Pityrogramma calomelanos* usando como explante circinio (frondas jóvenes) y fronda. En este trabajo el circinio fue mejor explante que la fronda. En esa especie, las frondas parecen tener una tendencia natural para desarrollar gametofitos, porque esta respuesta se presentó cuando se utilizaron citocininas (BAP sola o en combinación con cinetina) y BAP con auxinas (ANA e IAA). Nosotros no tuvimos resultados positivos empleando como explantes frondas de *Pteridium aquilinum*, a pesar de que se utilizaron frondas muy jóvenes.

9.2.2 Rizoma

En el presente trabajo, el rizoma respondió de forma diferencial ante los tratamientos (Tabla 5). Las auxinas (ANA, 2,4-D), en todas las concentraciones probadas generaron tanto gametofitos como esporofitos (Fig. 1a). La respuesta ante la presencia de citocininas, dependió tanto del tipo de hormona utilizada como de la concentración. En el caso de la citocina se obtuvieron las dos respuestas, presencia de gametofitos y esporofitos; esta respuesta se presentó sólo en concentraciones bajas de tidiazurón (0.05mg/L). Mientras que con BAP y tidiazurón a altas concentraciones (0.1 y 0.2 mg/L), sólo se desarrollaron gametofitos.

Tabla 5.- Tratamientos probados para la inducción de organogénesis a partir de rizoma en *P. aquilinum*

Tratamiento		Gametofito		Esporofito	
Hormona	Concentración (mg/L)	% de respuesta	Peso promedio por tratamiento (g)	Número de individuos por tratamiento	Promedio de brotes por explante
Cinetina	0.5	80.0	0.19	1	0.06
	1	73.3	0.38	3	0.2
	2	93.3	0.64	1	0.06
BAP	0.5	100	0.48	0	0
	1	77.7	0.13	0	0
	2	46.1	0.02	0	0
Tidiazurón	0.05	81.8	0.21	1	0.09
	0.1	76.9	0.14	0	0
	0.2	57.14	0.09	0	0
ANA	0.5	60	0.14	12	0.8
	1	80	0.39	6	0.4
	2	53.8	0.18	11	0.91
2-4-D	0.5	41.6	0.15	17	1.41
	1	83.3	0.36	1	0.08

9.2.2.1 Inducción de gametofitos.

Se obtuvieron gametofitos en todos los tratamientos probados. Hubo porcentajes de respuesta mayores al 80% en por lo menos una concentración de cada una de la hormonas utilizadas (Gráfica 1). Esto pone en evidencia el gran potencial morfogénico de la especie para generar gametofitos a partir de tejidos somáticos. Los porcentajes de respuestas más altos se obtuvieron con 2 mg/L de cinetina y 0.5 mg/L de BAP, 93.3 y 100%, respectivamente (Fig. 2).

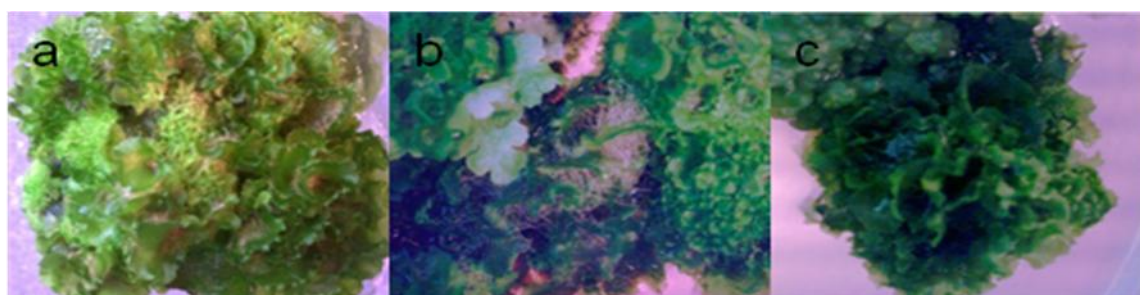


Figura 2. Respuesta morfogénica del rizoma. (a) Gametofitos regenerados en cinetina 0.5 mg/L. (b) Gametofitos regenerados en cinetina 2.0 mg/L. (c) Gametofitos regenerados en 0.5 mg/L de BAP.

La biomasa de gametofitos obtenida por tratamiento fue similar en todos los tratamientos probados, con excepción de las concentraciones más altas de BAP y tidiázurón (2.0 mg/L y 0.2 mg/L, respectivamente), que evidentemente reducen la biomasa obtenida por tratamiento (Tabla 6).

Se seleccionaron dos tratamientos como la mejor respuesta, porque con ellos se obtuvieron las mejores combinaciones de frecuencia de respuesta y biomasa de gametofitos obtenida:

- 0.5 mg/L de BAP con un 100% de respuesta y 0.48 g de biomasa total
- 2mg/L de cinetina con 93.3 % de respuesta y el valor más alto de peso seco 0.64g de biomasa total.

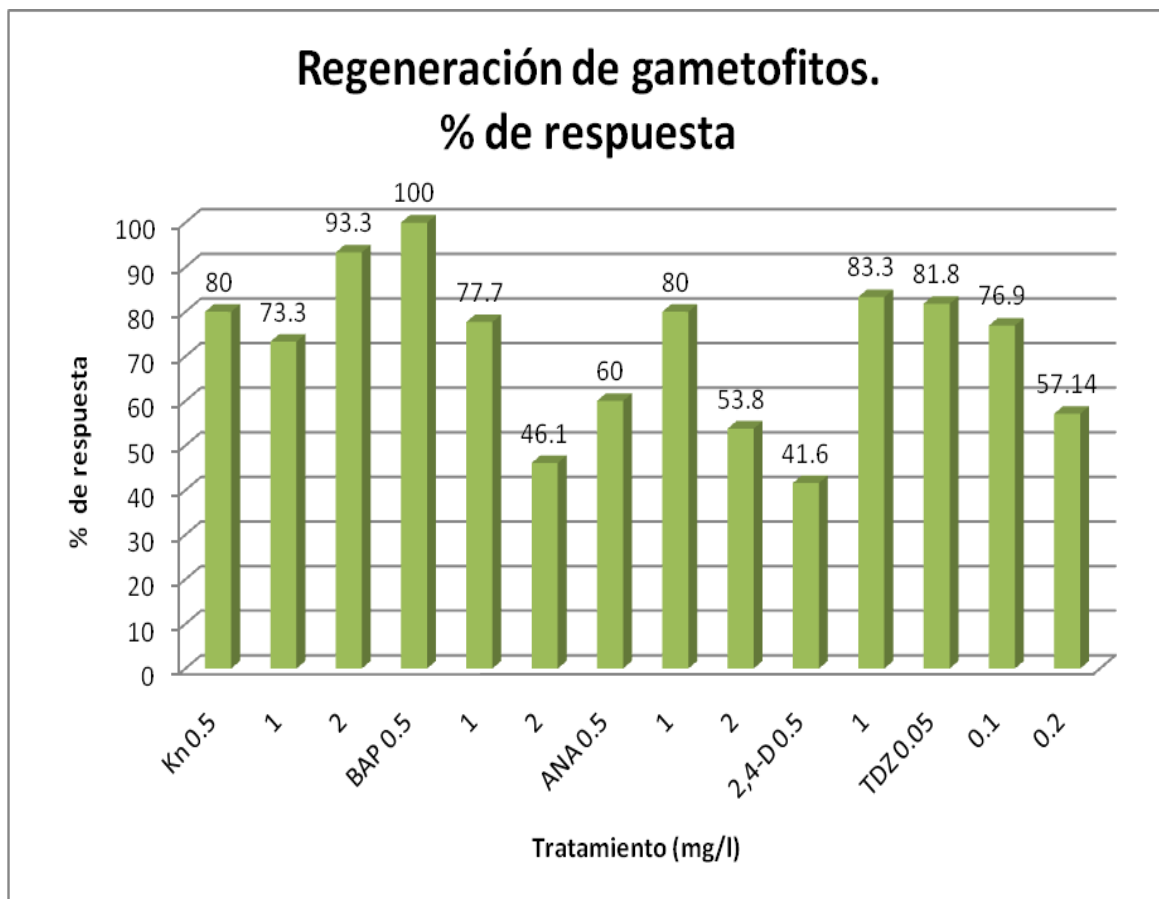


Figura 3. Gráfica. Regeneración de gametofitos.

Tabla 6. Peso seco de los gametofitos.

Peso seco promedio (g) (Promedio $\pm$ desviación estándar)					
RCV (mg/L)	Cinetina	BAP	ANA	2,4-D	TDZ*
0.5	0.1965 $\pm$ 0.1732ab	0.4829 $\pm$ 0.1340ab	0.1472 $\pm$ 0.2082ab	0.1506 $\pm$ 0.02857ab	0.2106 $\pm$ 0.06548ab
1	0.3895 $\pm$ 0.1078ab	0.1386 $\pm$ 0.2401ab	0.3900 $\pm$ 0.2269ab	0.3665 $\pm$ 0.1713ab	0.1413 $\pm$ 0.2447ab
2	0.6491 $\pm$ 0.2293a	0.02413 $\pm$ 0.04825b	0.1802 $\pm$ 0.2548ab	—	0.09838 $\pm$ 0.1968b

*Concentración: 0.05, 0.1 y 0.2 mg/L.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la mayor parte de las plantas estudiadas, el rizoma suele dar resultados positivos. Se ha reportado la formación de gametofitos cuando se emplea como explante rizoma en: *P. cambricum.*, *Asplenium nidus*, *Adiantum. capillus-veneris*, *Davallia. canariensis* y *Adiantum adiantum –nigrum* (Fernández et. al, 1997; Bertrand et. al, 1999; Somer et. al, 2010).

De acuerdo con estos estudios previos y con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la regeneración de gametofitos es una respuesta que parece ser fácilmente inducible con BAP. En *P. cambricum* se obtuvieron gametofitos en presencia de 10 mg/L de BAP (Bertrand *et. al*, 1999). En el mismo trabajo se menciona que la combinación de BAP con ANA inhibió el desarrollo de los gametofitos. Somer *et. al*, 2010, registra resultados similares para *Adiantum. capillus-veneris*, *Davallia. canariensis* y *Adiantum adiantum-nigrum* usando como explante rizoma pre-tratado con BAP y subcultivados en medio MS.

También se han obtenido gametofitos en *Asplenium nidus* a partir de homogenizados de rizoma pre-tratados con 4.4 μ m de BAP, aunque estos gametofitos no alcanzaron la madurez sexual. (Fernández *et. al*, 1997).

Es difícil comparar los resultados de esta investigación con estudios precedentes de micropropagación en helechos, porque en la literatura existe un cierto grado de confusión ya que los autores esperan encontrar procesos morfogenéticos similares a los que presentan las angiospermas, buscan callo o estructuras embriogénicas. En la literatura son muy escasos los resultados que reportan la eficiencia de formación de gametofitos.

En este estudio, la formación de gametofitos se presentó en todos los tratamientos de manera directa a partir del rizoma. La presencia de citocininas parece inducir un proceso de reproducción conocido como apospórico, que ocurre de forma natural en varios helechos, incluido *P. aquilinum*.

Raghavan, 1989, define aposporia como una estrategia reproductiva que resulta en la generación de gametofitos, sin que se lleve a cabo la meiosis o la esporulación. En diferentes especies de helechos, varios aspectos de la inducción y subsecuente desarrollo de gametofitos apospóricos han sido estudiados, incluyendo la separación de órganos desde la planta parental, el aislamiento fisiológico de células esporofíticas de sus contiguas, contacto con la superficie húmeda del medio del cultivo, material joven de la planta o medio de cultivo con bajas concentraciones de sacarosa. Sin embargo, los mecanismos

moleculares involucrados en el proceso apóspórico son poco conocidos. (Ambrožič-Dolinšek, 2002)

Los gametofitos obtenidos con estos tratamientos presentaron una morfología típica en forma de corazón (Fig. 2b y 2c). Estaban presentes gametofitos masculinos, de forma espatular (en mayor proporción) y femeninos, de mayor tamaño que los masculinos y con amplias alas. Los gametofitos fueron fértiles; después de ser transplantados y regados periódicamente generaron una población normal de esporofitos.

Después de una cuidadosa observación de todos los tejidos al microscopio, resultó evidente que en todos los casos, los gametofitos se generaron de forma directa. *P. aquilinum* no generó callo como respuesta a la presencia de citocininas o auxinas en ninguna de las concentraciones probadas.

9.2.2.2 Inducción de esporofitos.

Se obtuvieron esporofitos, mediante organogénesis directa en nueve tratamientos (Tabla 5). Las auxinas resultaron ser mejores que las citocinas como inductoras de desarrollo de esporofitos. No se obtuvo ningún esporofito en los tratamientos de BAP, ni con las mayores concentraciones de tidiazuron; y con cinetina se obtuvo un número muy reducido de individuos.

En presencia de auxinas se desarrollaron más individuos por explante (Fig. 3). El mayor número de individuos regenerados, 17, se dio con 0.5 mg/L de 2,4-D, seguido de 12 y 11 individuos obtenidos con 0.5 mg/L y 2 mg/L de ANA, respectivamente (Gráfica 2). De acuerdo con el análisis estadístico, todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto a 0.5 mg/L de 2,4-D. Por esta razón se seleccionó este tratamiento como la mejor respuesta (Tabla 7).



Figura 4. Respuesta morfogénica del rizoma. (a) Esporofitos inducidos in vitro. (b) Esporofito regenerado en 0.5 mg/L de ANA. (c) Esporofito regenerados en 0.5 mg/L de 2,4-D.

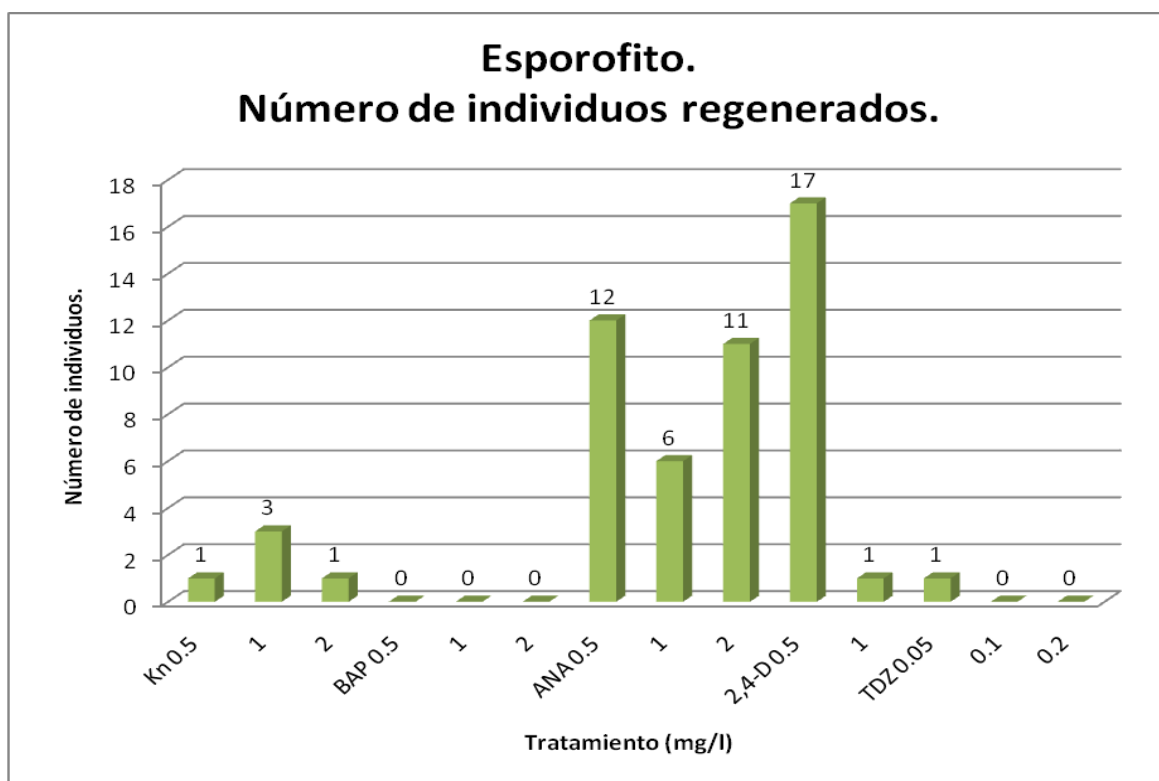


Figura 5. Gráfica. Regeneración de esporofitos.

Tabla 7. Esporofitos regenerados

Esporofito. Promedio de individuos regenerados (Media $\pm$ desviación estándar)					
RCV (mg/L)	Cinetina	BAP	ANA	2,4-D	TDZ*
0.5	0.06667 $\pm$ 0.25a	0.0 $\pm$ 0.a	0.8 $\pm$ 1.821a	1.417 $\pm$ 1.929b	0.09091 $\pm$ 0.3015a
1	0.2 $\pm$ 0.4140a	0.0 $\pm$ 0.a	0.4 $\pm$ 0.9103a	0.08333 $\pm$ 0.288a	0.0 $\pm$ 0.0a
2	0.06667 $\pm$ 0.25a	0.0 $\pm$ 0.a	0.9167 $\pm$ 1.379a	—	0.0 $\pm$ 0.0a

*Concentración: 0.05, 0.1 y 0.2 mg/l.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Hay reportes previos en la literatura de generación de esporofitos a partir de frondas. Chen y Read (1983), reportaron la obtención de frondas a partir de puntas de rizoma de 6 mm de largo para *Rumura adiantiformis*. Los explantes fueron cultivados en medio Prague, modificado con 2% de sacarosa, sustancias orgánicas y citocininas (BAP, 2iP, cinetina y zeatina) a diferentes concentraciones. Contrario a lo sucedió en este trabajo, en donde las citocininas inhibieron la inducción de esporofitos y estimularon la producción de gametofitos. Chen y Read tuvieron resultados diferentes con distintas citocininas. El mejor resultado lo obtuvieron con 10 mg/L de 2iP, al inducir 25 frondas. De igual manera indujeron frondas en presencia de 10 mg/L cinetina y 1 mg/L de zeatina, 23 y 21 frondas, respectivamente. Sin embargo la presencia de BAP en el medio de cultivo, inhibió el desarrollo de frondas, coincidentemente con los resultados registrados con *Pteridium aquilinum*.

La obtención de esporofitos a partir de rizoma también se ha reportado en otros helechos. Fernández y colaboradores (1997), reportaron la regeneración de esporofitos en *Pteris ensiformis* y en *Asplenium nidus* a partir de homogenizados de rizomas pretratados con 4.4 μ M de BAP en medio MS. De acuerdo con este estudio, BAP indujo la proliferación de yemas en el rizoma de los helechos y su efecto se vio incrementado después de la homogenización del órgano. Somer y colaboradores (2010), también reportan la inducción de esporofitos al usar como explante, homogenizados de rizoma pre-tratado con BAP.

Por otro lado Hedge *et. al.*, 2006, reportó la formación de callo para *Drynaria quercifolia* a partir de secciones de rizoma en medio de inducción Knop's en presencia de auxinas, 2,4-D, 2,4,5-T y picloram en concentraciones de 1.0, 5.0, 10.0 y 15.0 mg/L y con 10 y 15 mg/L de IBA. IAA y ANA no indujeron una cantidad significativa de callo. Así mismo no hubo formación de callo en explantes cultivados sobre medio que únicamente tuvieron citocininas, BAP, cinetina, 2iP, TDZ o zeatina en cualquier concentración 0-15 mg/L. Los callos obtenidos en medio con auxinas regeneraron en esporofitos cuando fueron subcultivados en medio basal que contenía 2iP. En la presente investigación *P. aquilinum* no generó callo como respuesta a la presencia de citocininas ni de ninguna de las auxinas probadas, en las diferentes concentraciones.

Sin embargo, cabe la duda de la inducción de callo en helechos ya que muchos autores esperan respuestas típicas de plantas fanerógamas y hay dificultades para identificar la presencia de gametofitos (que se caracterizan por su forma de corazón) porque los confunden con callo, el cual es una masa celular amorfa hialina, o con estructuras embriogénicas globulares, que son típicas de angiospermas.

Esta cuestión no permite establecer si los esporofitos obtenidos previa "formación de callo" fueron generados a partir de gametofitos que fueron confundidos con callo, ni tampoco se establece en ninguno de los artículos revisados si los gametofitos inducidos vía organogénesis originaron esporofitos a través de la fecundación.

Por esta misma razón es indispensable el uso de técnicas de citogenética para poder establecer con claridad los posibles procesos de organogénesis que se pueden llegar a presentar en la micropropagación de helechos.

Como hemos venido revisando, la respuesta morfogénica varía de acuerdo a los distintos factores involucrados en la micropropagación, tales como tipo de explante, tipo de hormona y concentración usada. Es por esto que a pesar de que la capacidad del rizoma de generar tanto gametofitos como esporofitos se ha observado ya en otras especies, no hay forma de saber si este es el mejor

explante sólo para *P. aquilinum* o si en general es un buen explante para helechos. De acuerdo a lo anterior, los métodos de micropropagación que han sido investigados para algunas especies de helechos, así como el establecido en la presente investigación para *P. aquilinum* son específicos para la especie en particular y del explante donador.

9.3 Aclimatización

Los esporofitos obtenidos por organogénesis directa y los que fueron resultado de la fertilización *in vitro* de gametofitos fueron enraizados *in vitro* y aclimatizados en condiciones de invernadero. Las plantas obtenidas presentaron un desarrollo normal y la morfología típica de la especie, en todos los casos.

9.4 Análisis histológico

Se hicieron análisis histológicos a los esporofitos obtenidos por organogénesis directa. Se observó una morfología normal en los helechos, por lo que no se presentó variación somaclonal de los individuos regenerados *in vitro*. El rizoma presentó en corte transversal, un dictiostele típico de los esporofitos obtenidos vía fecundación (Fig 4). Las frondas presentaron las traqueidas areoladas y estomas funcionales característicos de la especie (Fig. 5).

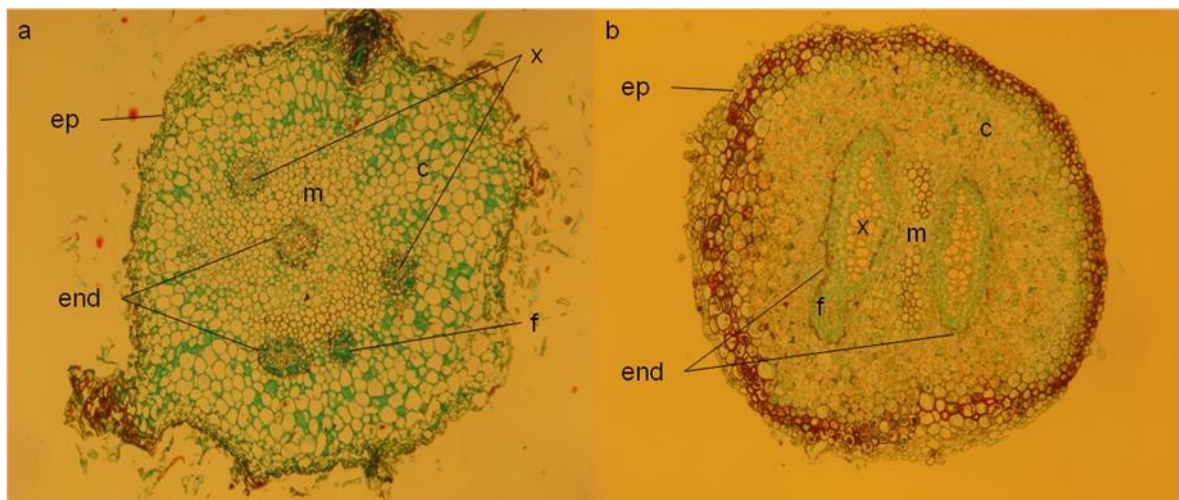


Figura 6. Corte transversal del rizoma. (a) Corte trasversal del rizoma del esporofito obtenido en 2 mg/L de Cinetina. (b) Corte transversal del rizoma del esporofito obtenido en 2 mg/L de ANA. e = epidermis, c = cortex, end = endodermis, f =floema, x = xilema, m= medula

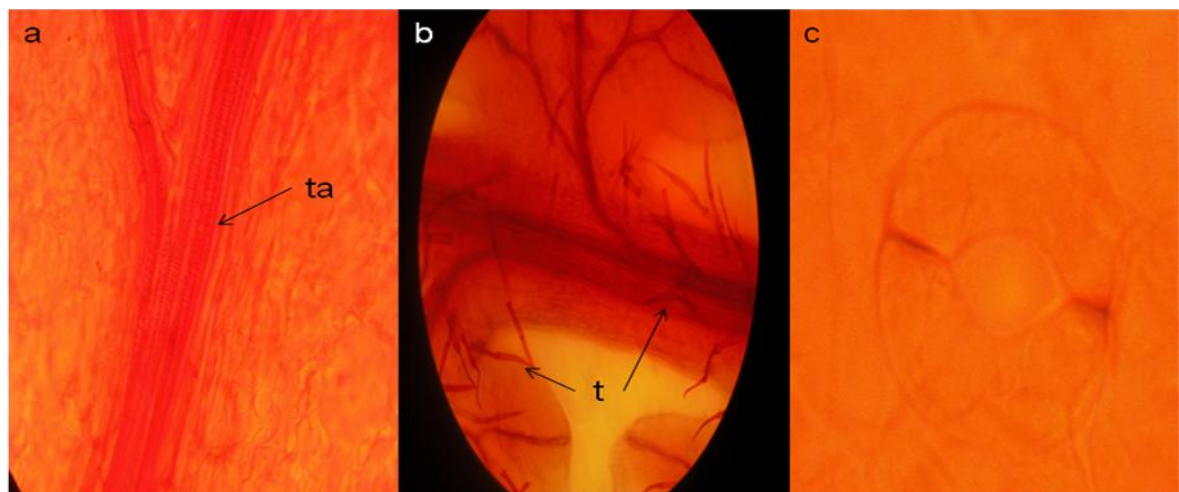


Figura 7. Análisis histológico. a) Traqueidas areoladas. (b)Tricomas. (c) Estomas.

10 CONCLUSIONES

- El mejor explante para la micropropagación de *Pteridium aquilinum* es el rizoma.
- Los mejores tratamientos para la inducción de gametofitos de *P. aquilinum* fueron 0.5 mg/L de BAP y 2mg/L de cinetina.
- El proceso de inducción de gametofitos de *P. aquilinum* fue mediante organogénesis directa.
- Se generaron en este proceso de micropropagación gametofitos femeninos y masculinos maduros.
- El mejor tratamiento para la inducción de esporofitos de *P. aquilinum* fue 0.5 mg/L de 2,4-D.
- El proceso de inducción de esporofitos de *P. aquilinum* fue mediante organogénesis directa.
- Los esporofitos obtenidos *in vitro* no presentaron variaciones anatómicas.
- El rizoma de los esporofitos de *P. aquilinum* generados presenta un dictiostele.
- Las frondas de los gametofitos de *P. aquilinum* inducidos presentan estomas y traqueidas areoladas.
- Este protocolo de micropropagación puede establecerse como el primer paso para el mejoramiento de la especie en su capacidad de acumular metales pesados.

11 PERSPECTIVAS A FUTURO

A pesar de que hay reportes previos en la literatura de obtención de gametofitos o esporofitos por cultivo de tejidos vegetales, no existen en realidad procesos eficientes de micropropagación para helechos. En los estudios anteriores no se optimiza para una especie la obtención tanto de gametofitos como de esporofitos, entre otras razones, debido a la confusión existente, que ocasiona que los autores no distingan entre gametofitos, esporofitos y callo. Y sobre todo, porque no se reconoce la presencia de gametofitos, como un paso previo para generar esporofitos. No se incluye en los protocolos un proceso que propicie la fertilización *in vitro* de los gametofitos, para inducir el desarrollo de esporofitos.

En el presente trabajo se ha establecido un sistema de micropropagación muy eficiente para *Pteridium aquilinum*, a partir del rizoma, por dos vías:

- Organogénesis directa de gametofitos, fertilización *in vitro* y obtención de esporofitos
- Organogénesis directa de esporofitos

El establecimiento de un sistema de micropropagación para cualquier planta con potencial fitorremediador es de suma importancia, porque la biorremediación de suelos y cuerpos de agua requiere plantas con capacidades uniformes y estables de resistencia y acumulación de metales pesados.

La posibilidad de contar con dos sistemas de micropropagación (generación de gametofitos y de esporofitos) abre múltiples oportunidades para el mejoramiento genético de esta especie, ya que es posible emplear de forma coordinada técnicas de selección masal o variación somaclonal y los dos sistemas de propagación desarrollados, para obtener plantas hiperacumuladoras. De esta forma es posible desarrollar diferentes variedades e incluso una sola variedad, con una mayor capacidad de acumular diferentes metales pesados.

12 ANEXOS

Anexo 1. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Compuestos	mg·L ⁻¹
<i>Macronutrientes</i>	
(NH ₄)NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	175
CaCl ₂ 2H ₂ O	440
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.5
<i>Micronutrientes</i>	
MnSO ₄ H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6
H ₃ B0 ₃	12.4
KI	0.82
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00024
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000024
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000024
<i>Compuestos orgánicos</i>	
Tiamina	0.10
Ac. Nicotínico	5
Piridoxina	5
Myo-inositol	100
Glicina	2
Sacarosa	30000
Agar	9000

Se ajustó pH a 5.7

Anexo 2. Medio ½ MS

Compuestos	mg·l ⁻¹
<i>Macronutrientes</i>	
(NH ₄)NO ₃	825
KNO ₃	950
MgSO ₄ 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	87.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	220
FeSO ₄ 7H ₂ O	13.9
Na ₂ EDTA	18.65
<i>Micronutrientes</i>	
MnSO ₄ H ₂ O	8.45
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	4.3
H ₃ B0 ₃	6.2
KI	0.41
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00012
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000012
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000012
<i>Compuestos orgánicos</i>	
Tiamina	0.05
Ac. Nicotínico	2.5
Piridoxina	2.5
Myo-inositol	50
Glicina	1
Sacarosa	15000
Agar	9000

Se ajustó pH a 5.7

Anexo 3. Medio MS (1/2 de macronutrientes)

Compuestos	mg·l ⁻¹
<i>Macronutrientes</i>	
(NH ₄)NO ₃	825
KNO ₃	950
MgSO ₄ 7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	87.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	220
FeSO ₄ 7H ₂ O	13.9
Na ₂ EDTA	18.65
<i>Micronutrientes</i>	
MnSO ₄ H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	8.6
H ₃ B0 ₃	12.4
KI	0.82
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.00024
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.000024
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.000024
<i>Compuestos orgánicos</i>	
Tiamina	0.10
Ac. Nicotínico	5
Piridoxina	5
Myo-inositol	100
Glicina	2
Sacarosa	30000
Agar	9000

Se ajustó pH a 5.7

13 BIBLIOGRAFÍA

Adriano, D. C., W. W. Wenzel, J. Vangronsveld y N. S. Bolan. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122 (2-4): 121-142.

Aguilera, H. N. 1989. *Tratado de edafología de México*. Tomo 1. Facultad de Ciencias. Dirección General de Publicaciones, México 222 pp.

Ambrožič-Dolinšek, J., M. Camloh, B. Bohanec y J. Zel. 2002. Apospory in leaf culture of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum*). *Plant Cell Reproduction* 20 (9): 791-796.

Anawar, H. M., A. García-Sánchez, A. Murciego y T. Buyolo. 2006. Exposure and bioavailability of arsenic in contaminated soils from the La Parrilla, Spain. *Environmental Geology* 50 (2): 170-179.

Anderson, L. y M. M. Walsh. 2007. Arsenic uptake by common marsh fern *Thelypteris palustris* and its potential for phytoremediation. *Science of the Total Environment* 379 (2-3): 203-205.

Barriada, J. L., S. Caridad, P. Lodeiro, R. Herrero y M. E. Sastre de Vicente. 2009. Physicochemical characterization of the ubiquitous bracken fern as useful biomaterial for preconcentration of heavy metals. *Bioresource Technology* 100 (4): 1561-1567.

Bertrand, A. M., M. A. Albuerne, H. Fernández, A. González y R. Sánchez-Tamés. 1999. *In vitro* organogénesis of *Polypodium cambricum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57(1): 65-69.

Carpena R. O. y M.P. Bernal. 2007. Claves para la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas* 16 (2): 1-3.

Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Disponible en: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf.

Chaney, R L., M. Malik, Y.M. Li, S.L. Brown, E. P. Brewer, J. S. Angle y A. J. M. Baker. 1997. Phytoremediation of soils metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 279-284.

Chang P., J. Y. Kim, K. W. Kim. 2005. Concentrations of arsenic and heavy metals in vegetation at two mine tailings in South Korea. *Environmental Geochemistry and Health* 27 (2): 109-119.

Chávez, V. M. 1993. Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Mia.) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis profesional de Doctorado (Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 148 pp.

Chawla, H. S. 2002. *Introduction to plant biotechonology*. Science Publishers, India 528 pp.

Chen, S. Y., y P. E. Read. 1983. Micropropagation of leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*). *Selected Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 96: 266-269.

Clemens, S., H. G. Palmgren y U. Krämer. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7 (7): 309-315.

Collin, H. A. y S. Edwards. 1998. *Plant cell culture*. Springer BioScientific Publishers. U.K 157 pp.

Cunningham, S. D., W. R. Berti y J. W. Huang. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology* 13 (9): 393-397.

Eapen, S. y S. F. D'Souza. 2005. Projects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* 23 (2): 97- 114.

Eslava S. F. J. 2009. *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn especie hiperacumuladora de cromo hexavalente. Tesis profesional de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 89 pp.

Fernández, H., A Bertrand, R. Sánchez-Tamés. 1997. Plantlet regeneration in *Asplenium nidus* L. and *Pteris ensiformis* L. by homogenization of BA treated rhizomes. *Scientia Horticulturae* 68 (1-4): 243-247.

Fernández, H. y M. A. Revilla. 2003. *In vitro* culture of ornamental ferns. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73 (1): 1-13.

Francesconi, K., P. Visoottiviseth, W. Sridokchan y W. Goessler. 2002. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanus*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *The Science of the Total Environmental* 284 (1-3): 27-35.

George, E. F., M. A. Hall y G. J. Deklerk. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. The Backg Rounk Springer. The Netherlands 501 pp.

Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108 (2): 105-120.

Hedge, S., V. K. Menon, R. Norcnha y L. D'Souza. 2006. Callus culture and an unconventional pattern of sporophyte regeneration in *Prynario quercifolia* — a medicinal fern. *In Vitro Cellular and Developemental Biology* 42 (6): 508-513.

Kachenko A., B. Singh y N. Bhatia. 2007. Heavy metal tolerance in common fern species. *Australian Journal of Botany* 55 (1): 63-73.

Khan, F. I., T. Husain y R. Hejazi. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Enviromental Management* 71 (2): 95-122.

Krämer, U. 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 133-141.

LeDuc, D. L. y N. Terry. 2005. Phytoremediation of toxic trace elements in soils and water. *Enviromental Biotechnology* 32 (11-12): 514-520.

Litchfield, C. 2005. Thirty years and counting: Bioremediation in its prime? *BioScience* 55 (3): 273-279.

Ma, L. M., K. M. Komar, C. Tu, W. Zhang, Y. Cai, E. D. Kenelley. 2001. A fern that hyperaccumulate arsenic. *Nature. Brief communications* 409: 579.

Marrs, R.H. y A. S. Watt. 2006. Biological flora of the British Isles: *Pteridium aquilinum*. *Journal of Ecology* 94: 1277-1321.

Martin, K. P., S. Sini, C. L. Zhang, A. Slater y P. V. Madhusoodnan. 2006. Efficient induction of apospory and apogamy *in vitro* in silver fern (*Pityrogramma calomelanos* L.). *Plant Cell Reports* 25 (12): 1300-1307.

Mirsal, I. A. 2004. *Soil pollution, origin, monitoring and remediation*. Springer, Berlin 252 pp.

Moran R. y Riba R. 1995. Flora mesoamericana. *Psilotaceae* a *Salviniaceae*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F 470 pp.

Mulligan, C. N., R. N. Yong y B. F. Gibbs. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60 (1-4): 193-207.

Muñiz, M., B. Pérez, J. Márquez y A. Mendoza. 2008. Developmental gametophyte morphology of seven species of *Thelypteris* subg. *Cyclosorus* (Thelypteridaceae). *Micron* 39: 1351-1362.

Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Newman, M. C. y M. A. Unger. 2002. *Fundamentals of ecotoxicology*. Lewis Publishers. U. S. A. 458 pp.

Odum, E.P. y G. W. Barrett. 2006. *Fundamentos de Ecología*. Thomson, México 598 pp.

Olivares, E., E. Peña, E. Marcano, J. Mostacero, G. Aguilar, M. Benítez y E. Rengifo. 2008. Aluminum accumulation and its relationship with mineral plant nutrients in 12 pteridophytes from Venezuela. *Environmental and Experimental Botany* 65 (1):132-141.

Orozco, C. B., A. Pérez-Serrano, M. N. González-Delgado y F. J. Rodríguez-Vidal. 2003. *Contaminación ambiental. Una visión desde la química*. Thomson, Madrid. 682 pp.

Perez, M-B. E. M., M. R. Ramírez, P. H. Nuñez y A.N. Ochoa. 1999. *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 179 pp.

Phillips, G. C. 2004. Invited review: *in vitro* morphogenesis in plants - recent advances. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. Plant 40 (4): 342-345.

Pierzynski, G. M., J. T. Sims, y G. F. Vance. 2000. *Soils and environmental quality*. CRC Press, Florida 459 pp.

Porta, C. J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 1999. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Mundi-Prensa, Madrid 849 pp.

Prasad, M. N. V. 2003. Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: hyper for commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (5). 764-780.

Rahman M., H. Hasegawa, K. Veda, T. Maki y M. Rahman. 2008. Influence of phosphate and iron in selective uptake of arsenic species by water fern (*Salvinia natans* L.). *Chemical Engineering Journal* 145 (12): 179-184.

Rathinasabapath, B., L. Q. Ma y M. Srivastava. 2006. *Arsenic Hyperaccumulating ferns and their application to phytoremediation of arsenic contaminated soils*. En: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Vol. III. Global Science Books, U. K. <http://lqma.ifas.ufl.edu/Publication/Saba-06a.pdf>.

Razdam K. 2003. Introduction to plant tissue culture. *Science Publishers*. India 375 pp.

Ritman, B. E. y P. L. McCarty. 2001. *Environmental biotechnology: principles and applications*. McGrawHill, New York 754 pp.

Roca, W.N. y L. A. Mroginski (Eds). 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicación*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia 953 pp.

Saval, S. 1998. *La reparación del daño. Aspectos técnicos: Remediación y restauración*. <http://www.bibliojuridica.org/libros/1/141/9.pdf>. En: La responsabilidad jurídica en el daño ambiental (Estudios varios). Biblioteca jurídica Virtual, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.bibliojuridica.org/libros>.

SEMARNAT, 2005. Indicadores básicos de desempeño ambiental de México. (Flores, A., L. González y C. Rodríguez. Coordinadores). 336 pp.

Scullion, J. 2006. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* 93 (2): 51-65.

Singh, S., S. H. Kang, A. Mulchandani y W. Chen. 2008. Bioremediation: Environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 19 (5): 437-444.

Somer, M., R. Arbesú, V. Menéndez, M. A. Revilla y H. Fernández. 2010. Sporophyte induction studies in ferns *in vitro*. *Euphytica* 171 (2): 263-210.

Sturman, P. J., P. S. Stewart, A. B. Cunningham, E. J. Bouwer y J. H. Wolfram. 1995. Engineering scale-up of *in situ* bioremediation processes: a review. *Journal of Contaminant Hydrology* 19(3): 171-203

Sugiyama, M. 1999. Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology* 2 (1): 61-64.

Tan, K. H. 1994. *Environmental soil science*. CRC Press, New York 452 pp.

Tyson, M. J., E. Sheffield y T. V. Callaghan. 1999. Uptake, transport and seasonal recycling of ^{134}Cs applied experimentally to bracken (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). *Journal of Environmental Radioactivity* 46 (1): 1-14.

——— 1999. Uptake, allocation, accumulation and ecological implications of ^{85}Sr in bracken (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). *Journal of Environmental Radioactivity* 46 (1): 15-25.

Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73 (7): 1163-1172.

Volke, S. T. y J. A. Velasco. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Sistema de Publicaciones INE, México 62 pp.

Wei, C. Y. y T. B. Chen. 2006. Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation. *Chemosphere* 63 (6): 1048-1053.

Yoshihara, T. K. Tsunokawa, Y. Miyano, Y. Arashima, H. Hodoshima, K. Shoji, H. Shimada y F. Gota. 2005. Induction of callus from a metal hypertolerant fern, *Athyrium yokoscense*, and evaluation effects cadmium tolerance and accumulation capacity. *Plant Cell Reports* 23 (8): 579-585.

Zhang, X., A. J. Lin, F. J. Zhao, G. Z. Zu, G.L. Duan y Y. G. Zhu. 2008. Arsenic acumulation by the aquatic fern *Azolla*: comparison of arsenic uptake, speciation and efflux by *A. caroliniana* and *A. filiculoides*. *Environmental Pollution* 156 (3): 1149-1155.