

Micropropagación de *Adiantum capillus-veneris* L.

Micropropagation of *Adiantum capillus-veneris* L.

J. Vilchez¹, N. Albany², L. Martínez¹, M. Molina² y C. Fernández¹

¹Departamento de Botánica, ²Departamento de Química, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, estado Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

El valor comercial del helecho *Adiantum capillus-veneris* L., motivo el desarrollo de un protocolo de micropropagación; evaluando la germinación de esporas en tres concentraciones de sacarosa (1,5; 3 y 4,5% m/v), la multiplicación de esporofitos en 25 y 100% de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ con 0 y 4,4 μM 6 bencilaminopurina; además se evaluaron tres sistemas de cultivo: medio gelificado, líquido e inmersión temporal (IT). En la aclimatización se evaluó el vermicompost (0; 5 y 10% v/v) en el sustrato. El 80,6% de esporas germinaron con el 1,5% de sacarosa; seguido con la multiplicación en 25% de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ con 9,51 g de biomasa fresca; aumentando a 10,71 g en IT. Todos los helechos se aclimataron utilizando 5 y 10% de vermicompost.

Palabras clave: germinación de esporas, sistema de cultivo, multiplicación *in vitro*.

Abstract

The commercial value of the fern *Adiantum capillus-veneris* L., encouraged to develop a micropropagation protocol; evaluating spore germination in three concentrations of sucrose (1.5, 3 and 4.5% m/v), the multiplication of sporophytes in 25 and 100% of $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ with 0 and 4.4 μM 6 benzylaminopurine; also three culture systems were evaluated: gelled medium, liquid and temporary immersion (TI). Acclimatization was evaluated in the vermicompost (0, 5 and 10% v/v) in the substrate. 80.6% of spores germinated with 1.5% sucrose, followed by multiplication in 25% $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ with 9.51 g of fresh biomass, increasing to 10.71 g in TIS. All ferns acclimated with 5 and 10% of the vermicompost.

Key words: spore germination, culture system, *in vitro* multiplication.

Introducción

La micropropagación representa un método de reproducción de plantas en espacios confinados y bien controlados que permite obtener un gran número de plantas uniformes genéticamente y libres de patógenos que afecten su crecimiento. Las plantas ornamentales son las plantas predilectas para ser reproducidas por diversos métodos de propagación *in vitro*, debido a que existe una mayor disposición en el mercado para ofertar un precio más elevado que las otras plantas cultivadas. El helecho tinajero (*Adiantum capillus-veneris* L.) no escapa de estas pautas del mercado; puesto que, por su follaje es ampliamente utilizado como planta ornamental en jardines de exteriores e interiores, en la decoración de arreglos florales; e incluso como planta medicinal por sus propiedades fungistáticas (Maridass *et al.*, 2010; Somer *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

Una de las ventajas de los helechos es su alta capacidad de reproducción asexual, que puede darse por diferentes partes de la planta, por yemas o por cultivo de tejidos; este último principalmente por medio de la germinación de esporas. Esta característica hace al helecho tinajero aun más atractivo para desarrollar un protocolo de micropropagación. La germinación de esporas genera un gran coeficiente de multiplicación *in vitro* (Wu *et al.*, 2010), convirtiéndose en un método eficiente en el cual se logran controlar los factores ambientales, que limitan la germinación de esporas en condiciones *in vivo*.

Introduction

Micropropagation is a method of plant breeding done in controlled and confined spaces which allows obtaining a large number of genetically uniform plants and free of pathogens that affect their growth. Ornamental plants are the favorite plants to be reproduced by different *in vitro* propagation methods, because there is a greater willingness in the market to offer a higher price than other cultivated plants. Tinajero fern (*Adiantum capillus-veneris* L.) does not escape these market, since its foliage is widely used as an ornamental plant in exteriors and interiors gardens, in floral decoration; and even as a medicinal plant by its fungi properties (Maridass *et al.*, 2010; Somer *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

One of the advantages of ferns is their high asexual reproduction capacity, which can occur by different parts of the ground, buds or tissue culture; the latter mainly through the germination of spores. This feature makes even more attractive to develop a micropropagation protocol of tinajero fern. The spore germination generates a large coefficient of *in vitro* propagation (Wu *et al.*, 2010), turning it into an efficient method in which are accomplished to controlling the environmental factors that limit the germination of spores *in vivo* conditions.

The spore germination *in vitro* has been studied in different types of ferns and with different purposes; among them *A. flabellulatum* (Wu *et al.*, 2010); *A. capillus-veneris*, *Asplenium adiantum-nigrum*,

La germinación de esporas *in vitro* ha sido estudiada en diferentes tipos de helechos, con diferentes propósitos; entre ellos *A. flabellulatum* (Wu *et al.*, 2010); *A. capillus-veneris*, *Asplenium adiantum-nigrum*, *Dryopteris filix-mas*, *Polypodium cambricum* y *Dicksonia antarctica* (Somer *et al.*, 2010); y específicamente para la especie *A. capillus-veneris*; Kuriyama *et al.* (2004) evaluó la composición del medio de cultivo para la producción de esporofitos; mientras que Maridass *et al.* (2010) incluyeron estudios de multiplicación *in vitro* y transferencia a condiciones *in vivo*.

Sin embargo, los sistemas de cultivo *in vitro* son muy diversos, y en la estandarización de éstos no solo influye la capacidad intrínseca del material vegetal propagado, sino también la selección de los componentes y sistemas de medios de cultivo, para incrementar la eficiencia en la reproducción masiva; que permitan la disminución de los costos de producción al obtener mayor número de plantas. Por esta razón, se evaluaron alternativas para la micropropagación del helecho tinajero basadas en la reducción de los componentes del medio de cultivo para la germinación de esporas, el empleo de sistemas de medios líquidos para la multiplicación de los esporófitos y la utilización de sustratos enriquecidos con vermicompost para la transferencia de las vitroplantas a condiciones *ex vitro*.

El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para la micropropagación del helecho *Adiantum capillus-veneris* L.

Dryopteris filix-mas, *Polypodium cambricum* and *Dicksonia antarctica* (Somer *et al.*, 2010); and specifically for the species *A. capillus-veneris*; Kuriyama *et al.* (2004) evaluated the the culture medium composition for the production of sporophytes; meanwhile, Maridass *et al.* (2010) included studies of *in vitro* propagation and transfer conditions *in vivo*.

However, *in vitro* culture systems are very different, and in the standardization of these not only the intrinsic capacity of the propagated plant material has an influence but also the selection of components and systems of cultivation, to increase the efficiency in mass reproduction; that allow the reduction of cost production to obtain a greater number of plants. For this reason, alternatives were evaluated for the microspread of tinajero fern based on the components reduction on the way of cultivation for the spore germination, the use of liquid systems for the multiplication of the sporophytes and the use of substrata enriched with vermicompost for the transference of the vitroplantas to *ex vitro* conditions.

The aim of this research was to establish a protocol for the micropropagation of fern *Adiantum capillus-veneris* L.

Materials and methods

The research was developed at the biotechnology laboratories “Prof. Silvia León de Sierralta” and plant physiology “Merylyn Marín”, Agronomy faculty, Universidad del Zulia.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología “Profa. Silvia León de Sierralta” y Fisiología Vegetal “Merilyn Marín”, Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia.

Como material vegetal, se emplearon esporangios recolectados de frondas del helecho tinajero adulto (*A. capillus-veneris*). Para iniciar la fase de establecimiento, se cortaron secciones de hojas con esporangios fértiles de aproximadamente 25 mm² como explante inicial, que luego fueron desinfectadas con una solución de NaClO al 2% v/v durante 10 min y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente se sembró un explante por tubo de ensayo con 20 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), modificado con una reducción al 25% de (NH₄)NO₃ y gelificado con 6 g.L⁻¹ de Agargel. Se colocaron 40 tubos por tratamiento en un diseño aleatorizado con el fin de determinar el efecto de tres concentraciones de sacarosa (1,5; 3 y 4,5% m/v) en el medio de cultivo, sobre el porcentaje de germinación de esporas dos semanas después de la siembra. Las evaluaciones del porcentaje de germinación de esporas se realizaron seis semanas después de realizada la siembra.

En la fase de multiplicación se realizaron dos experimentos. En el primer experimento se estudió el efecto de la concentración del 25% y 100% del (NH₄)NO₃ en el medio de cultivo MS, en interacción con la 6-bencilaminopurina (6-BAP) en concentraciones de 0 y 4,4 μM como regulador de crecimiento. Se sembraron dos

As plant material, sporangia collected from adult tinajero fern fronds were employed (*A. capillus-veneris*). To initiate the establishment phase, sections of leaves with fertile sporangia were cut of approximately 25 mm² as initial explant, which were later disinfected with a NaClO solution at 2% v/v for 10 min and rinsed three times with sterile distilled water. Then an explant was planted by test tube with 20 mL of MS (Murashige and Skoog, 1962), modified with a reduction 25% of (NH₄)NO₃ and gelled with 6 g.L⁻¹ Agargel. 40 pipes were placed by treatment in a randomized design in order to determine the effect of three saccharose concentrations (1.5; 3 and 4.5% m/v) in the culture medium, on the germination percentage of spores two weeks after the sowing. The percentage evaluations of the spore germination were carried out six weeks after the sowing.

In the multiplication phase two experiments were carried out. In the first experiment was studied the concentration effect of 25% and 100% of the (NH₄)NO₃ in the MS culture medium, in interaction with the 6-benzylaminopurine (6-BAP) at concentrations of 0 and 4.4 μM as a growth regulator. Two protallus were sown per biotechnology glass bottle of 100 mL, 25 mL of culture medium gelled with 6 g.L⁻¹ Agargel, using a split plot design with 10 replications per treatment to evaluate the fresh biomass production and number of fronds per explants, inoculated within the eighth week of cultivation.

In a second multiplication experiment three cropping systems were evaluated under standard

prótalos por frasco de vidrio biotecnológico de 100 mL de capacidad, con 25 mL de medio de cultivo gelificado con 6 g.L⁻¹ de Agargel, bajo un diseño factorial con 10 repeticiones por tratamiento para evaluar producción de biomasa fresca y número de frondas por explante inoculado a las ocho semanas de cultivo.

En un segundo experimento de multiplicación se evaluaron tres sistemas de cultivo bajo sus condiciones estándares sobre la producción de biomasa fresca, número de frondas y número de pinnas por fronda, en un diseño al azar con diez repeticiones por tratamiento. Los tipos de sistemas fueron: cultivo en medio gelificado en frascos biotecnológicos con 25 mL de medio gelificado con Agargel 6 g.L⁻¹; cultivo en medio líquido en agitación a 60 rpm en erlemmeyer de 200 mL con 25 mL de medio de cultivo y cultivo en sistema de inmersión temporal (IT) tipo RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado) de 900 mL de capacidad con 200 mL de medio de cultivo líquido con una frecuencia de tres veces al día durante 1 min de inmersión. En los sistemas en medio de cultivo gelificado y medio de cultivo líquido en agitación se colocaron dos esporofitos jóvenes por envase; mientras que en los sistemas de inmersión temporal se colocaron cuatro esporofitos jóvenes por RITA®. En todos los sistemas de cultivo se utilizó el medio de cultivo MS modificado con una reducción al 25% del (NH₄)NO₃. Las evaluaciones se realizaron a las ocho semanas de cultivo.

En la fase de aclimatización, se evaluó el efecto tres concentraciones de vermicompost (0; 5 y 10% v/v), en con-

ditions on the fresh biomass production, number of fronds and number of pinnae per frond, in a randomized design with four replications per treatment. The types of systems were: culture in gelled media in biotechnological jars with 25 mL of gel medium with Agargel 6 g.L⁻¹; culture in liquid medium in agitation at 60 rpm in erlemmeyer of 200 mL with 25 mL of medium cultivation and temporary immersion cultivation system (IT) type RITA® (automatic temporary immersion container) of 900 mL of capacity with 200 mL of liquid culture medium with a frequency of three times a day for 1 min of immersion. In systems in culture medium and gelled liquid culture medium in agitation two non-sporophytes young were placed; while in temporary immersion medium were placed four non-sporophytes young by RITA®. The MS culture medium modified with a reduction to 25% of the (NH₄)NO₃ was used in all farming systems. Assessments were conducted at eight weeks of cultivation.

In the acclimatization phase, the effect of three concentrations of vermicompost (0, 5 and 10% v/v) were evaluated in transparent polyethylene containers with holes of 250 cc capacity with 40 cc of the substrate of river based compost sieving with concentrations of the evaluated vermicompost. Two young sporophytes were observed coming from the multiplication phase by container, using ten containers per treatment. The containers were kept closed with perforated lids to allow gas exchange during the first four weeks of

tenedores de polietileno transparente de orificios de 250 cc de capacidad con 40 cc del sustrato a base abono de río tamizado con las concentraciones de vermicompost evaluadas. Se sembraron dos esporofitos jóvenes provenientes de la fase de multiplicación por contenedor, empleando diez contenedores por tratamiento. Los contenedores se mantuvieron cerrados con tapas perforadas para permitir el intercambio gaseoso durante las cuatro primeras semanas de evaluación, y el sustrato se mantuvo húmedo mediante la aplicación de agua destilada aplicada una vez por semana. Después de ocho semanas de sembrados los esporangios se evaluó el porcentaje de helechos aclimatados, número y longitud de las frondas.

En todos los experimentos las condiciones de cultivo fueron: temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, intensidad lumínica de $215\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, bajo luz blanca fluorescente continua y humedad relativa promedio de 46%.

Todos los datos de las variables evaluadas en cada fase, fueron procesados mediante el programa computarizado Statistix 8.0 para ambiente Microsoft® Windows, mediante un análisis de la varianza (ANADEVA) y la prueba Tukey para determinar diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos aplicados.

Resultados y discusión

Fase de establecimiento: germinación de esporas

Las esporas comenzaron a germinar luego de dos semanas de cultivo, con la concentración de 1,5% m/v de sacarosa en el medio de cultivo;

evaluation, and the substrate is kept moist through the application of distilled water applied once a week. The percentage of acclimated ferns, number and length of the fronds were evaluated after eight weeks of seeded the sporangia.

In all the experiments the crop conditions were: temperature of $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, light intensity of $215\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, under continuous white fluorescent light and average relative humidity of 46%.

All the data of the variables evaluated in each phase, was processed using the computerized program Statistix 8.0 Windows Microsoft®, using a variance analysis (ANADEVA) and the Tukey mean test to determine statistical differences among the different treatments applied.

Results and discussion

Establishment phase: germination of the spores

The spores began to germinate after two weeks of culture with the 1.5% m/v concentration of sucrose in the culture medium; meanwhile sucrose concentrations of 3 and 4.5% m/v, the germination of spores was evidenced after three weeks of cultivation. It was observed that as the concentration of sucrose increased in the culture medium the germination was delayed and in lower percentage, obtaining the highest value of spore germination percentage (80.6%) with the 1.5% m/v concentration of sucrose and the lowest value of spore germination percentage (41.7%) with 4.5% of sucrose concentration, resulting these values statistically different ($P\leq 0.05$) (table 1). A response

mientras que para las concentraciones de sacarosa de 3 y 4,5% m/v, la germinación de esporas se evidenció luego de tres semanas de cultivo. Se observó que a medida que se aumentó la concentración de sacarosa en el medio de cultivo la germinación fue más tardía y en menor porcentaje, obteniéndose el mayor valor de porcentaje de germinación de esporas (80,6%) con la concentración de 1,5% m/v de sacarosa y el menor valor de porcentaje de germinación de esporas (41,7%) con la concentración de 4,5% de sacarosa; resultando estos valores estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$) (cuadro 1). Una respuesta con similar tendencia fue observada por Wu *et al.* (2010), quienes evaluaron concentraciones de sacarosa de 0; 1,5; 3; 4,5 y 6% m/v, en medio MS, para la germinación de *A. flabellulatum*. Esta tendencia de una baja respuesta a la germinación a medida que aumentó la sacarosa en el medio de cultivo podría deberse a un menor potencial hídrico en la célula (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2008); debido que a medi-

with a similar tendency was observed by Wu *et al.* (2010), who evaluated sucrose concentrations of 0; 1.5; 3; 4.5 and 6% m/v, in MS medium for the germination of *A. flabellulatum*. This trend of a low response to the germination increased as the sucrose in the culture medium, and this might be due to a minor water potential in the cell (Sánchez-Díaz and Aguirreolea, 2008); since at the time that the sucrose increases in the culture medium, the explants ability for absorbing water from the culture medium decreases and with this the physiological processes that lead to the germination.

***In vitro* multiplication phase**

The statistical analysis did not detect a significant effect by the use of 6-BAP (0 and 4.4 μM) as a growth regulator obtaining an average of 6.38 g of fresh biomass and 9.1 fronds; and it showed differences ($P \leq 0.05$) for $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ concentrations employed, on the fresh biomass and number of fronds after eight weeks of cultivation (table 2). The highest values of fresh

Cuadro 1. Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre el porcentaje de germinación de esporas de *Adiantum capillus-veneris* L.

Table 1. Effect of the sucrose concentration in the culture medium on the germination percentage of *Adiantum capillus-veneris* L spores.

Porcentaje de sacarosa (m/v)	Porcentaje de germinación de esporas
1,5	80,6 ^a
3	52,5 ^b
4,5	41,7 ^c

Letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

da que se incrementó la sacarosa en el medio de cultivo disminuyó la capacidad del explante de absorber agua del medio y con ello los procesos fisiológicos que condujeron a la germinación.

Fase de multiplicación *in vitro*

El análisis estadístico no detectó efecto significativo por el empleo del 6-BAP (0 y 4,4 μM) como regulador de crecimiento obteniendo un promedio de 6,38 g de biomasa fresca y 9,1 frondas; mientras que arrojó diferencias ($P \leq 0,05$) para las concentraciones de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ empleadas, sobre la biomasa fresca y el número de frondas después de ocho semanas de cultivo (cuadro 2). Los mayores valores de biomasa fresca (9,5 g) y de número de frondas (9,0) se obtuvieron con la reducción al 25% de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, en comparación con un 6,45 g de biomasa fresca y 0,2 de frondas por esporofito obtenidos al emplear el 100% de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ en el medio de cultivo de MS. Al respecto, Kuriyama *et al.* (2010) encontraron resultados similares e indicaron que la eliminación o reducción del $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ en el medio de cultivo, promovió el desarro-

biomass (9.5 g) and number of fronds (9.0) were obtained with the reduction of 25% $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$, compared to 6.45 g of fresh biomass and fronds by Sporophyte and 0.2 fronds obtained by using 100% of $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ in the Ms culture medium. In this regard, Kuriyama *et al.* (2010) found similar results, and indicated that the elimination or reduction of the $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ in the culture medium, promoted the development of the Sporophyte by sexual reproduction; since the nitrogen source may inhibit the fertilization and development of spores. In this sense Thorpe (1980), refers that the source and amount of nitrogen as well as phytohormones in the culture media are determinants in the differentiation and morphogenesis in *in vitro* culture of plants.

Evaluating the multiplication of young no-sporophytes *A. capillus-veneris* in three cropping systems was observed significant differences in all the variables studied (table 3). The highest values of fresh biomass were obtained with the cultivation of young sporophytes in temporary immersion

Cuadro 2. Efecto de la reducción del $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sobre la producción de biomasa fresca y el número de frondas de *Adiantum capillus-veneris* L.

Table 2. Effect of the $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ reduction in the MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) on the fresh biomass production and the fronds number of *Adiantum capillus-veneris* L.

Porcentaje de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	Biomasa fresca (g)	Número de frondas
25	9,51 ^a	9,0 ^a
100	6,45 ^b	0,2 ^b

Letras distintas difirieron estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

llo del esporofito por reproducción sexual; debido a que la fuente de nitrógeno podría inhibir la fertilización y desarrollo de las esporas. En este sentido, Thorpe (1980), refirió que la fuente y cantidad de nitrógeno, así como las fitohormonas suministradas en los medios de cultivo fueron determinantes en la diferenciación y morfogénesis en el cultivo *in vitro* de plantas.

Al evaluar la multiplicación de esporofitos jóvenes de *A. capillus-veneris* en tres sistemas de cultivo, se encontraron diferencias significativas para todas las variables estudiadas (cuadro 3). Los mayores valores de biomasa fresca se obtuvieron con el cultivo de esporofitos jóvenes en sistemas de inmersión temporal (10,71 g), seguidos por el cultivo en medio líquido (6,88 g) y gelificado (6,85 g); siendo estos últimos dos valores similares estadísticamente entre sí, pero inferiores al valor obtenido en los RITA®. Sin embargo, una menor cantidad de biomasa fresca en el medio líquido desarrolló similar cantidad de frondas y

systems (10.71 g), followed by liquid culture medium (6.88 g) and gelled (6.85 g); being these two values statistically similar among themselves, but lower than the value obtained in the RITA®. However, a smaller quantity of fresh biomass in the liquid medium developed similar amount of fronds and young non-sporophytes pinnae regarding the temporal immersion systems; observing that these systems in liquid medium favored the development of the spore in young people with regard to temporary immersion; observing that in these systems of liquid media favored the development of the sporophyte. Some authors have noted that there is a tendency to obtain higher values of fresh biomass when systems were used temporary immersion (Vilchez *et al.*, 2011), which first would be related to the water relations, the gaseous interchange and the absorption of nutrients favored by these cropping systems.

Cuadro 3. Efecto del sistema de cultivo sobre la biomasa fresca, número de frondas y número de pinnas por fronda de *Adiantum capillus-veneris* L.

Table 3. Effect of the cultivation system on the fresh biomass, number of fronds and number of segments by frond of *Adiantum capillus-veneris* L.

Sistema de cultivo	Biomasa fresca (g)	Número de frondas	Número de pinnas/fronda
Inmersión Temporal	10,71 ^a	2,27 ^a	3,38 ^a
Medio líquido agitado	6,88 ^b	2,25 ^a	2,35 ^a
Medio gelificado	6,85 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b

Letras distintas difirieron estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

pinnas en esporofitos jóvenes con respecto a los sistemas de inmersión temporal; observándose que en estos sistemas de medios líquidos se favoreció el desarrollo del esporofito. Algunos autores han señalado que existe una tendencia a obtener valores superiores de biomasa fresca cuando se utilizaron sistemas de inmersión temporal (Vilchez *et al.*, 2011), lo cual pudiera estar relacionado con las relaciones hídricas, el intercambio gaseoso y la absorción de nutrientes que se favorecen en estos sistemas de cultivo.

Fase de aclimatización

Una semana después de la siembra de los esporofitos para la fase de aclimatización, se observó que comenzaron a deshidratarse las frondas de los helechos en todos los tratamientos; sin embargo, los rizomas se mantuvieron vivos y posterior a las tres semanas comenzaron a brotar y crecer nuevamente lográndose un 100% de los helechos aclimatados en los sustratos que contenían vermicompost (5 y 10%); resultando ambos tratamientos estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$) al tratamiento testigo (0% de vermicompost), en el cual solo brotaron el 40% de los helechos sembrados (cuadro 4). Estos resultados fueron similares a los reportados por Wu *et al.* (2010), quienes lograron un 90% de sobrevivencia en la aclimatización de *A. flabellulatum* en una sustrato constituido por una mezcla de perlita y hojas compostadas. Por lo que en ambas investigaciones se destacaron las bondades de las fuentes orgánicas que aportaron los nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas en la fase de aclimatización que condujeron a la adaptación de las plan-

Acclimatization phase

A week after the first planting of sporophytes for the acclimatization phase, it was observed that these began to dehydrate the fronds of ferns in all treatments; however, the rhizomes were kept alive and after three weeks started to sprout and grow again achieving 100% of the ferns acclimated on substrates containing vermicompost (5 and 10%), resulting in both statistically different treatments ($P \leq 0.05$) to control (0% vermicompost) treatment, which sprang up only 40% of the ferns planted (table 4). These results were similar to those reported by Wu *et al.* (2010), who achieved 90% of survival in the acclimatization of *A. flabellulatum* in a substrate consisting of a mixture of perlite and composted leaves. Both investigations show the benefits of organic sources that provide the nutrients needed for the growth and development of plants in the acclimatization phase which leads to the adaptation of plants *in vitro* conditions to *ex vitro* conditions. Especially the use of the vermicompost, which, according to Agramonte *et al.* (1998) was one of the more complete and comprehensive organic fertilizers; characterized by being very lightweight, odorless, with nutrients such as N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu Zn and Mo; and also facilitates the conversion of nitrogen and organic phosphorus to more digestible forms by plants

For the frond length of ferns, the statistical analysis determined that 5% of vermicompost substrate allowed obtaining the highest average value of length frond (6.67 cm); in comparison

Cuadro 4. Efecto del porcentaje de vermicompost sobre el porcentaje de aclimatización y longitud de las frondas del helecho *Adiantum capillus-veneris* L.

Table 4. Effect of the vermicompost percentage on the acclimatization percentage and frond length of the *Adiantum capillus-veneris* L. fern.

Porcentaje de vermicompost (v/v)	Porcentaje de aclimatización	Longitud de frondas (cm)
0	40 ^b	5,29 ^b
5	100 ^a	6,67 ^a
10	100 ^a	5,74 ^b

Letras distintas difirieron estadísticamente ($P < 0,05$) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

tas de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Especialmente el uso del vermicompost; el cual, según Agramonte *et al.* (1998) fue uno de los abonos orgánicos más completos e integral; que se caracterizó por ser muy liviano, inoloro, que aportó nutrientes como N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu Zn y Mo; y que además facilitó la conversión del nitrógeno y el fósforo orgánico a las formas asimilables por las plantas.

Para la longitud de las frondas de los helechos, el análisis estadístico determinó que el 5% de vermicompost en el sustrato permitió obtener el mayor valor promedio de longitud de fronda (6,67 cm); en comparación a los valores alcanzados con el 0% (5,29 cm) y 10% (5,74 cm) de vermicompost. Estos resultados pudieran ser explicados sobre la base de las cualidades que presentó el vermicompost como fuente de nutrientes (Agramonte *et al.*, 1998); sin embargo, en esta investigación fue notorio que los sustratos que contenían

to the values achieved with 0% (5.29 cm) and 10% (5.74 cm) in vermicompost. These results could be explained on the basis of the qualities of vermicompost as a nutrient source (Agramonte *et al.*, 1998); however, in this research it was notorious that the substrates containing vermicompost (10% v/v) showed a common tendency to compress; which perhaps played a role in the normal growth and development of the ferns.

Conclusions

A protocol for the micropropagation of *A. capillus-veneris* fern was established, germinating their spores in culture with 1.5% m/v of sucrose, followed by the multiplication of sporophytes in culture with 25% m/v of $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ and without growth regulators; highlighting liquid culture media systems to promote the development of the sporophytes, and among them

mayor cantidad de vermicompost (10% v/v) mostraron una tendencia generalizada a apelmazarse; lo que quizás incidió en el normal crecimiento y desarrollo de los helechos.

Conclusiones

Se logró establecer un protocolo para la micropropagación del helecho *A. capillus-veneris* germinando sus esporas en medio de cultivo con 1,5% m/v de sacarosa, seguido de la multiplicación de los esporofitos en medio de cultivo con el 25% m/v de $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ y sin reguladores de crecimiento; destacando el empleo de sistemas de medios de cultivo líquidos para favorecer el desarrollo de los esporofitos, y entre ellos la inmersión temporal para incrementar la biomasa fresca. La aclimatización de los esporofitos fue eficiente en un sustrato de abono de río con 5% v/v de vermicompost.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia por el cofinanciamiento al proyecto de investigación VAC-CONDES-0576-10.

Literatura citada

- Agramonte, D., F. Jiménez y D. Rodríguez. 1998. Aclimatización. pp. 193-202. En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Primera edición. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Kuriyama, A., T. Kobayashi, S. Hayashi y M. Maeda. 2004. Medium composition

the temporary immersion for increasing the fresh biomass. The acclimation of the sporophytes was efficient in a river manure substratum with 5% v/v of vermicompost.

Acknowledgment

The authors want to thank the Scientific, Humanistic and Technological Board of Universidad del Zulia by co-financing the research project VAC-CONDES-0576-10.

End of english version

for the production of sporophytes of the fern *Adiantum capillus-veneris*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (73)6:580-582.

- Maridass, M., R. Mahesh, G. Raju y K. Muthuchelian. 2010. Clonal propagation of *Adiantum capillus veneris*. International Journal of Biological Technology 1(1):33-37.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Sánchez-Díaz, M. y M. Aguirreolea. 2008. El agua en la planta. Movimiento del agua en el sistema suelo-planta-atmósfera. pp. 25-39. En: Azcón Bieto, J. y Talón, M. (Eds). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Segunda edición. Interamericana McGraw Hill, Madrid.
- Somer, M., R. Arbesú, V. Menéndez, M. Revilla y H. Fernández. 2010. Sporophyte induction studies in ferns *in vitro*. Euphytica 171:203-210.
- Thorpe, T.A. 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological, and biochemical aspects. Int. Rev. Cytol. Suppl. 11A: 71-111.

- Vilchez, J., N. Albany, M. Martínez, M. Molina, C. Pirela, M. Molina, C. Alvarez y J. Chirinos. 2011. Multiplicación en sistemas de inmersión temporal y enraizamiento *ex vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Rev. Colomb. Biotecnol. 13(1):94-102.
- Wu, H., Y. Li-Ping, W. Yang y C. Long-Qing. 2010. Studies on *in vitro* culture of *Adiantum flabellulatum* from spores. Acta Horticulturae Sinica 37(3):457-464.