



PROPAGACIÓN DE *Thelypteris kunthii* EN EL LABORATORIO

PROPAGATION OF *Thelypteris kunthii* IN LABORATORY

Luis Felipe Juárez-Santillán^{1*}, María Isabel Saad-Villegas³, Carlos Alexander Lucho-Constantino², Fidel Alejandro Aguilar-Aguilar¹, Georgina Martínez Reséndiz¹ y Rosa Icela Beltrán Hernández²

¹Univerisdad Tecnológica de Gutiérrez Zamora, Área académica de Agrobiotecnología, Campus Gutiérrez Zamora, Carretera Gutiérrez Zamora-Boca de Lima Km 2.5 Gutiérrez Zamora, Veracruz, C. P. 93556, Tel. 7668451952.

²Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas. Laboratorio de Ciencias Ambientales. Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Ciudad Universitaria. Mineral de la Reforma, CP 42184, Hgo.

Tel. +52 771 71 72000 ext. 2211 Fax. +52 771 71 72000 ext. 6502.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Biología, Ciudad Universitaria.

*Autor de correspondencia: luis.santillan@utgz.edu.mx o ljuarezsantillan@yahoo.com.mx

Recibido 19 de mayo de 2020; aceptado 22 de junio de 2020

RESUMEN

La propagación de plantas con capacidad para hiperacumular metales tóxicos es importante, para que éstas puedan ser empleadas en procesos de fitorremediación. El objetivo principal de este trabajo fue, determinar el ciclo de vida de *Thelypteris kunthii*, así como su capacidad de germinar en condiciones de contaminación de Mn. Se logró el ciclo de vida de *T. kunthii*, posteriormente se germinaron esporas a diferentes concentraciones de Mn (0-15 mM). Los principales resultados indicaron que las esporas de *T. kunthii* presentan una germinación tipo vitaria, además de que puede germinar a diferentes concentraciones de Mn. Se pudo observar que, en la concentración de 6 mM de Mn, las

esporas presentaron la mayor germinación en menor tiempo, lo cual favorece, ya que esto aceleraría la aparición de un esporofito con potencial de acumular Mn, otro hallazgo importante es que a concentraciones superiores a 6 mM la germinación de algunas esporas presentó daño, pero otras, se pudieron desarrollar hasta llegar a la forma cordiforme para el proceso de fecundación. Estos resultados dan pie a realizar otros estudios que tengan por objetivo generar esporofitos con la capacidad acumular o hiperacumular Mn o algún otro metal tóxico.

PALABRAS CLAVE: helechos, manganeso, hiperacumulación, fitorremediación y propagación.

ABSTRACT

The propagation of plants with the ability to hyper accumulate toxic metals is essential for their implementation in the phytoremediation process. The main objective of this work was to determine the *Thelypteris kunthii* life cycle, and its ability to germinate under Mn contamination conditions. The *Thelypteris kunthii* cycle life was accomplished, and its spores were sprouted in different Mn concentrations (0-15 mM). The main results showed that the *T. kunthii* spores presented a vitaria type germination, and they can germinate under different Mn concentrations. It was also noted that the spores presented higher sprouts, in less time, in a Mn concentration of 6 mM, which is favorable in the acceleration of the sporophytes production with the potential to accumulate Mn. Another crucial finding is that some spores' sprouts were damaged in concentrations higher to 6 mM. However, some other spores could develop until reaching the cordiform shape for the fertilization process. These findings lead to do more further research aiming to produce sporophytes with the ability to accumulate or hyper accumulate Mn or any other toxic metal.

KEY WORDS: ferns, manganese, hyperaccumulation, phytoremediation and propagation.

INTRODUCCIÓN

Thelypteris kunthii, es una especie vegetal identificada como hiperacumuladora de Mn (Juárez-Santillán et al., 2010), por lo que es de interés desarrollar una técnica de propagación de esta especie vegetal para conocer el potencial real de acumulación. El Mn es un elemento esencial para las plantas, pero tóxico cuando supera concentraciones de 500 mg/kg, en planta seca (Reeves y Baker, 2000). Altos niveles de Mn en el suelo pueden conducir a un desbalance nutricional en las plantas, especialmente en relación con otros cationes divalentes tales como el Mg^{2+} y Ca^{2+} (Cenni et al., 1998).

La mayoría de los estudios en el área de fitorremediación se han enfocado en angiospermas, dejando a un lado las capacidades de otras divisiones vegetales, como las pteridofitas. Los helechos se desarrollaron en el periodo Devónico, hace aproximadamente 400 millones de años y aunque un gran número de especies se extinguieron durante el Carbonífero, muchas otras han sobrevivido (Reyes et al., 1995). Los helechos están presentes en ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, manifestando una gran diversidad de especies y de formas de vida (Pérez et al., 1995).

El ciclo de vida de los helechos se compone de dos

fases: una generación esporofítica y otra denominada gametofítica. La generación esporofítica es la que normalmente se conoce como planta compuesta (hoja, tallo, raíz), generalmente en el envés de las hojas se forman esporangios, los cuales pueden estar agrupados en estructuras en forma discoidal conocidas como soros. Dentro de los esporangios se forman las esporas, que son resultado de divisiones meióticas de células madres esporofíticas y por tanto son aploides; cada una contiene únicamente un juego de cromosomas. Cuando los esporangios maduran, liberan miles de esporas que son llevadas por el viento azarosamente, lo que favorece su dispersión a través de grandes distancias a diferentes sitios; en donde encuentran condiciones favorables para producir un gametofito (Reyes et al., 1995).

Cuando las esporas inician a germinar, forman gametofitos que en los primeros días tiene aspecto filamentoso, formado por una hilera de células, resultado de la división mitótica que definen el patrón de germinación. Posteriormente adquieren forma espatulada y presentan un meristemo pluricelular marginal que les permite continuar su crecimiento. Durante su desarrollo, dependiendo de la especie pueden formar tricomas o pelos, cuya función aún se desconoce (Reyes et al., 1995).

La forma de los gametofitos maduros puede ser acintada,

reniforme o cordiforme. Esta última en forma de corazón es la más frecuente en los helechos homosporicos. Los gametofitos, fase sexual de los helechos, cuando alcanzan su madurez forman órganos femeninos (arquegonios) y masculinos (anteridios). Aunque puede variar la localización de los gametangios en el talo, normalmente los arquegonios se forman por debajo de la escotadura meristemática, en la región anterior al cojinete, y los anteridios en la región posterior del talo cerca de o entre los rizoides. Normalmente son (dioicos) bisexuales y la fecundación ocurre entre gametos del mismo gametofito (intragametofítica), en ocasiones pueden ser unisexuales (monoicos) y entonces la fecundación es entre gametos de gametofitos diferentes (intergametofítica) (Reyes et al., 1995). Los arquegonios de los helechos tienen una forma similar a la de una botella, donde unas células forman el cuello que sobresale de la superficie del talo y otras en la parte globosa rodean a la oosfera que es el gameto femenino y están sumergidas en el gametofito. Por otra parte los anteridios son estructuras simples, globosas compuestas principalmente de tres células (basal, anular y opercular), donde se producen los anterozoides, es decir los gametos masculinos, los cuales tienen, motilidad y

por medio de agua se desplazan hasta el cuello de los arquegonios, por donde se introducen y descienden hasta fusionarse con la oosfera, de esta manera realizan la fecundación de un huevo o cigoto a partir del cual se inicia la generación esporofítica, (de 60 a 90 días para alcanzar la etapa esporofítica) (Reyes et al., 1995).

Se han encontrado una amplia variedad de especies de pteridofitas en sitios contaminados por metales tóxicos, ejemplos de ellas son: *Asplenium adiantum-nigrum*, *A. cuneifolium*, *A. hybrida*, *A. presolanense*, *A. rutamuraria*, *A. septentrionale*, *A. trichomanes*, *A. viride*, *Ceratopteris cornuta*, *Cheilanthes calyculata*, *Cheilanthes hirta*, *C. inaequalis* var. *Lanopetiolata*, *C. inaequalis* var. *inaequalis*, *Mohria lepigera*, *Nardia scalaris*, *Nothalaena marantae*, *Oligotrichum hercynicum*, *Ophiglossum lancifolium* y *Pellea calomelanos* (Vara y de Oliveira, 2003). Reeves y Baker (2000) reportaron 9 plantas hiperacumuladoras para Mn principalmente de las familias Apocynaceae, Cunoniaceae y Proteaceae. Xu et al. (2006), encontraron que *Phytolacca acinosa* Robx es una planta hiperacumuladora de Mn, además desarrolla una gran cantidad de biomasa y crece rápido, por lo que es una buena candidata para la fitorremediación de suelos contaminados con Mn. *Phytolacca acinosa* acumula

aproximadamente 19,300 mg Mn kg⁻¹ (Xue et al., 2004), mientras que la concentración normal de este elemento en plantas varía entre 20-500 mg Mn/kg (Reeves y Baker, 2000). Liu et al. (2006), confirmaron en un experimento con *Phytolacca acinosa*, *Geiffine* y *C. canadiensis* que *P. acinosa* presentó alta capacidad extractiva y un mejor comportamiento para sobrevivir en altas concentraciones de Mn (2000 µmol/L). *Phytolacca americana* ha sido identificada como una nueva planta hiperacumuladora de Mn, la máxima concentración en base seca que se encontró en esta planta fue de 8,000 mgMn/kg. La planta australiana *Gossia bidwillii* es considerada hiperacumuladora de Mn, ya que acumula 1.92 % de este elemento en base seca (Bidwell et al., 2002 y Yuan et al., 2007). En cuanto a estudios relacionados con helechos destacan los de Ma et al. (2001), en donde demuestran que *Pteris vittata* tiene un gran potencial para ser usada en la fitorremediación de suelos contaminados con As, esta especie acumula cerca de 23,000 mgAs/kg. Otras especies son *Pteris biaurita* L., *Pteris quadriaurita* Retz, *Pteris ryukyuensis* Tagawa, *Pteris cretica*, *P. longifolia* y *P. umbrosa* hiperacumuladoras de As (McGrath y Zhao, 2003); el promedio de la concentración de As es de 1,770 a 3,650 mgAs/kg en los

órganos aéreos y 182 a 507 mgAs/kg en las raíces de *Pteris biaurita* L., *Pteris quadriaurita* Retz y Tagawa después de haberlas colocado en 100 mgAs/kg de suelo (Srivastava et al., 2006 y Wei y Chen, 2006).

Thelypteris kunthii fue identificada en un estudio realizado por Juárez-Santillán et al. (2010), encontraron que acumuló concentraciones superiores a 5,000 ppm de Mn en raíz, además es una planta dominante en la zona minera de Molango, Hidalgo, que es un lugar con alta mineralización de Mn, por lo que el principal objetivo de este trabajo fue, generar esporofitos de *Thelypteris kunthii* resistentes al Mn a partir de esporas con el fin de conocer el ciclo de vida de esta especie, así como establecer la resistencia del gametofito al Mn, para determinar la concentración del elemento en la cual las esporas pueden germinar y desarrollar gametofitos adultos, esto permitirá sentar las bases, para que en estudios posteriores se realicen pruebas con esporofitos generados y puedan presentar potencial para ser empleados en fitorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

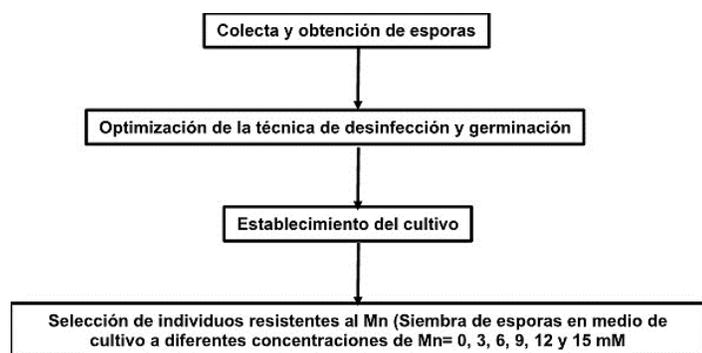


Imagen 1. Estrategia metodológica

Material biológico

En la localidad Molango, Hidalgo, se encontró un helecho el cual fue colectado e identificado con base a lo propuesto por Mickel y Beitel, 1998. Con el fin de obtener las esporas se recolectaron las pinnas fértiles (longitud 98° 44' 078'' O y latitud 20° 57' 026'' N), posteriormente se colocaron en sobres y se sellaron perfectamente para evitar la contaminación y pérdida de esporas. Los sobres con las pinnas fértiles se desecaron en condiciones naturales (temperatura ambiente) durante 15 días. Para obtener las esporas, las pinnas contenidas en los sobres se tamizaron con un tamiz de 0.074 micras de apertura (Mont inox) con el fin de eliminar los restos de esporangios y parafisas (John, 1994; Jones, 1996; Muñiz, 2005). Una vez obtenidas las esporas, se colocaron en refrigeración (4 °C) para favorecer su viabilidad.

Medio de cultivo

El medio de cultivo se preparó a partir del propuesto por

Murashige y Skoog (MS) en 1962. Se preparó un medio diluido al 50%, se esterilizó y posteriormente se vació en cajas de petri de 5 cm de diámetro, se dejó gelificar. Las cajas se guardaron en refrigeración (4°C) hasta su empleo para la siembra.

Desinfección de esporas

Para lograr una adecuada desinfección de las esporas y eliminar la contaminación en los cultivos, se realizaron cuatro experimentos a diferentes concentraciones de hipoclorito comercial, las concentraciones de hipoclorito fueron 2, 5, 7 y 10%. Para desinfectar se procedió de la siguiente forma: 1) en un tubo Eppendorf se agregaron 90 mg de esporas, 2) se agregó 1mL de la solución de hipoclorito, 3) se agitó durante 1 minuto, 4) se centrifugó durante 1 minuto, 5) se retiró el sobrenadante y 6) finalmente se lavaron las esporas tres veces con agua destilada estéril. De cada experimento con diferente concentración de hipoclorito se colocaron cinco cajas en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y otras cinco cajas sólo en oscuridad.

Una vez determinada la dosis de desinfección adecuada, se procedió a determinar el tiempo de exposición en la solución de hipoclorito, para lo cual se montaron tres experimentos a 2, 3 y 4 minutos, realizando lo mismo que se hizo en el proceso para determinar la dosis de

desinfección, lo único que varió fue el tiempo de agitación.

Germinación de esporas

Para determinar el tipo de germinación y desarrollo protálico, las esporas después de desinfectadas se sembraron en cajas de petri de 5 cm de diámetro con medio de cultivo y 0.15 mL de la solución que contenía las esporas. 15 cajas se dejaron en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, ya que en oscuridad no hay germinación como lo confirmaron los experimentos de la tabla 2.

Cuando aparecieron los gametos en el gametófito, éste se trasplantó a un frasco de vidrio de 100 mL, el cual contenía medio MS, en donde se originaron los esporofitos (los gametofitos trasplantados se regaron con 0.5 mL de agua destilada esterilizada una vez por semana).

Germinación de esporas a diferentes concentraciones de manganeso

Estandarizadas la desinfección y la germinación se procedió a realizar pruebas a diferentes concentraciones de Mn (0, 3, 6, 9, 12 y 15 mM), para determinar la dosis en la cual las esporas pueden crecer adecuadamente, esta etapa fue muy importante, porque es donde se logró crear plantas resistentes al Mn desde el inicio del ciclo

de vida. De cada concentración se sembraron 10 cajas y se dejaron en un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Nota: La siembra se realizó en una campana de flujo laminar, la cual se lavó previamente con detergente y posteriormente con etanol 96%, todo el material empleado fue esterilizado. El manipulador se lavó las manos con etanol al 70%, además de utilizar un mechero de alcohol cerca de la caja de siembra.

RESULTADOS

Desinfección

La desinfección es una etapa muy importante, ya que a partir de esta se logra obtener un mejor desarrollo en la germinación de esporas. De la desinfección se determinó que la dosis de hipoclorito (ClO^-) adecuada es a 7% (Tabla 1), a 2 y 5% germinaron (con contaminación) y a 10% no hubo germinación muy probablemente porque las esporas perdieron su viabilidad; el mejor tiempo de exposición al ClO^- es de 3 min, ya que a 2 min existe bastante contaminación y a 4 min la velocidad de germinación es más lenta (tabla 3), en la siembra se observó que las esporas necesitan de luz para poder germinar, ya que los experimento desarrollados en oscuridad no presentaron germinación (tabla 2).

Tabla 1. Experimentos expuestos a 16 h luz/8 h oscuridad evaluados a los cinco días de haber sembrado las esporas.

% ClO ⁻	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4	Caja 5
2	gC	gC	gC	gC	gC
5	gC	gC	gC	gC	gC
7	gC	g	g	gC	g
10	ng	ng	ng	ng	ng

g: germinación; gC: Germinación con contaminación; ng: no hay germinación

Tabla 2. Experimentos expuestos a oscuridad evaluados a los cinco días de haber sembrado las esporas.

% ClO ⁻	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4	Caja 5
2	ngC	ngC	ngC	ngC	ngC
5	ngC	ngC	ngC	ngC	ngC
7	ng	ng	ng	ngC	ng
10	ng	ng	ng	ng	ng

ngC: no hay germinación y se contaminó; ng: no hay germinación

Tabla 3. Desinfección con 7% de ClO⁻ a diferentes tiempos de exposición.

Tiempo (minutos)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4	Caja 5
2	gC	gC	gC	gC	gC
3	g	g	G	g	gC
4	gL	gL	gL	gL	gL

g: Germinación; gC: Contaminación con contaminación; gL: germinación lenta

Germinación de las esporas

Los resultados más importantes en cuanto a la germinación de esporas de *Thelypteris kunthii* indican que necesitan luz, y una temperatura de 26°C. El tipo de germinación es *Vittaria*, ya que la célula rizoidal se asoma inicialmente de la espora y en la base de la célula rizoidal se generan células de forma horizontal, esto ocurre a los cinco días después de haber sembrado las esporas (Imagen 1 B), posteriormente se produjo una lámina en cuadrantes por arriba del rizoide (Imagen 1 C), cada una de esas células se vuelven multicelulares (Imagen 1 D) (Atkinson y Stokey, 1964).

Desarrollo protálico

El desarrollo del prótalo de *Thelypteris kunthii* fue Drinaria (Nayar y Kaur, 1969), ya que presentó un delgado filamento germinal uniseriado (en cinco días, imagen 2 B), se formó una lámina protálica ancha espatulada (Imagen 2 C y D), con el transcurso del tiempo se hizo cordiforme (entre los 11 y 20 días después de la siembra, imagen 2 E), los tricomas aparecieron en la orilla de la lámina protálica (Imagen 2 F) y la aparición de gametos masculinos y femeninos sucedió alrededor de los 28 días de haber realizado la siembra (Imagen 2 G).

Una vez que aparecen tanto los anteridios (gameto masculino) como arquegonios (gameto femenino) en el

gametofito, inicia la fecundación de la oosfera por los anterozoides los cuales son liberados de los anteridios, dando lugar la fase esporofítica (Reyes et al., 1995). La fecundación se lleva a cabo por microcorrientes de agua que transportan a los anterozoides hasta la oosfera. El esporofito aparece entre los 60 - 90 días después de haber hecho la siembra (Riba et al., 2000), en este caso las esporas de *Thelypteris kunthii* lograron la formación del esporofito en el día 84 (Imagen 3), coincidiendo con lo antes reportado y de esta manera cerró el ciclo de vida (Imagen 4).

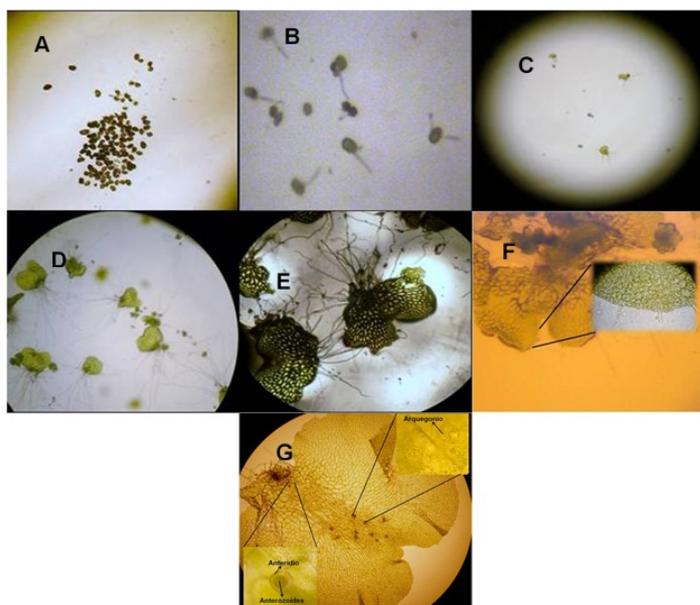


Imagen 2. Espora (A). Germinación tipo *Vittaria*, 2 a 5 días (B). Filamentos cortos de 4-6 células, 6 días (C). Gametofito espatulado, 8 días (D). Gametofito cordiforme, 20 días (E). Gametofito con tricomas, 20

días (F). Gametofito con anteridios y arquegonios cerca de la muesca, 28 días (G).

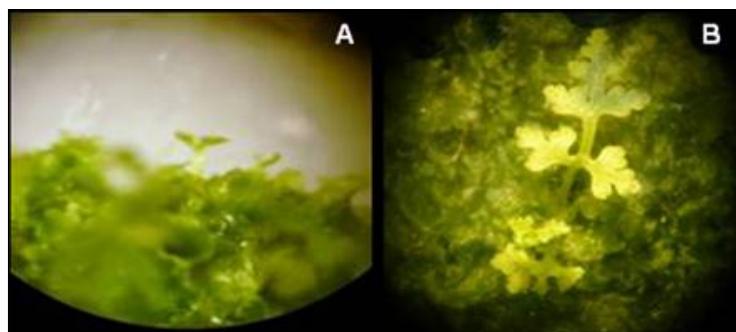


Imagen 3. Aparición del esporofito (A). Aparición de las dos primeras hojas en el esporofito (B).

Germinación de las esporas a diferentes concentraciones de manganeso

Las esporas lograron germinar en las diferentes concentraciones de Mn. En la Imagen 5 se observa que a 6 mM de Mn se presentó la mayor germinación de esporas (91.61 %), la primera evaluación se hizo a los 12 días de haber sembrado. En 0, 3, 9, 12 y 15 mM la germinación es menor (58.82, 72.21, 83.67, 74.64 y 71.40 % respectivamente, imagen 6).

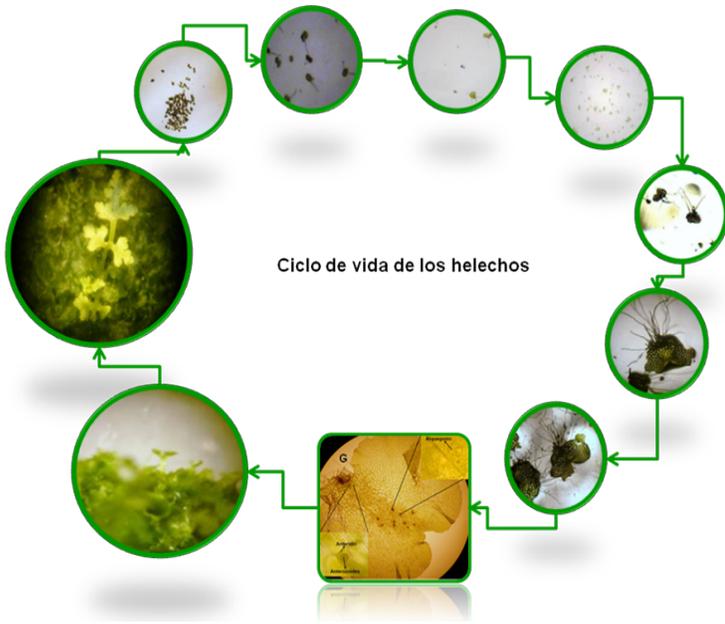


Imagen 4. Ciclo de vida de *Thelypteris kunthii*.

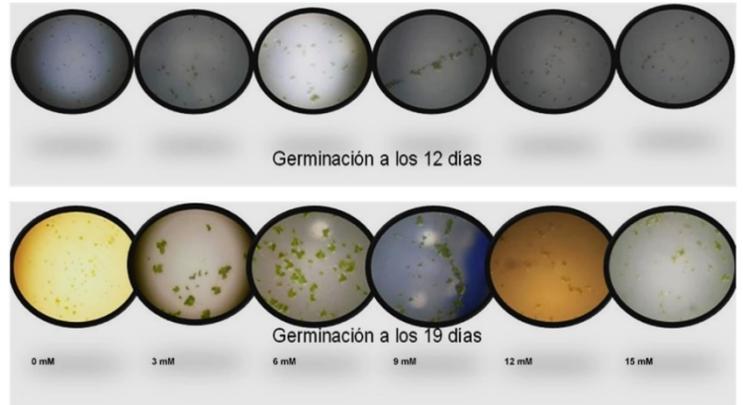


Imagen 7. Germinación de esporas en los días 12 y

19.

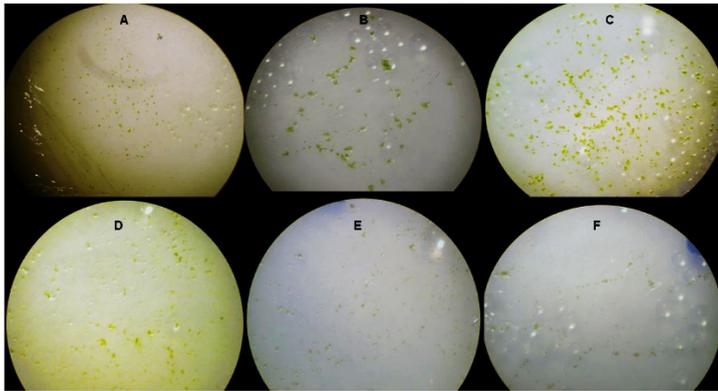


Imagen 5. Germinación de esporas; A) 0 mM de Mn, B) 3 mM de Mn, C) 6 mM de Mn, D) 9 mM de Mn, E) 12 mM de Mn, F) 15 mM de Mn.

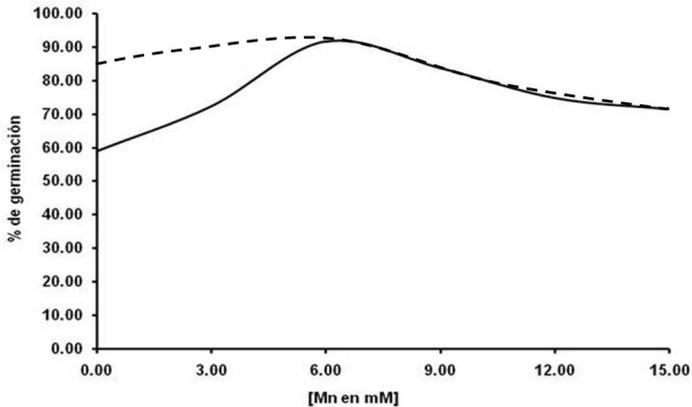


Imagen 6. Porcentaje de esporas germinadas (evaluación a los 12 días [-] y a los 20 días [- -]).

Cabe hacer mención que la germinación en el control y a 3 mM siguió aumentando hasta el día 19 con lo que se alcanzó el 85 % y 88 % respectivamente (imagen 7 y 8), en las demás concentraciones la germinación se mantuvo constante. Esto indica que la germinación de las esporas se logró acelerar conforme se incrementó la concentración de Mn hasta 6 mM. En cuanto al desarrollo protálico se pudo observar un aumento en las concentraciones de 0 a 6 mM y luego decreció (Imagen 6).

Hasta el momento no existen estudios que reporten la germinación de esporas a diferentes concentraciones de Mn. Resultados reportados por Xue et al., (2004) indican que las semillas de *Phytolcca acinosa* Roxb, germinan sin ningún problema a una concentración de 5 mM de Mn; por otra parte, Peng et al. (2008) primero dejó que

germinaran las semillas de *Phytolacca americana* L. y posteriormente las plántulas fueron trasplantadas agregándoles diferentes concentraciones de Mn (0.0091 – 10 mM), bajo estas condiciones las plantas no presentaron efectos de daño alguno, en nuestro caso las esporas germinan de una forma adecuada sin presentar daño a una concentración de 3 mM (Imagen 19 B). Lo importante es que las esporas de helechos son unicelulares y las semillas son estructuras pluricelulares, por lo que la resistencia observada en las esporas de este estudio es elevada si la comparamos con las semillas.

En el día 20 a concentraciones de 6, 9, 12 y 15 mM de Mn, el desarrollo de la lámina protálica presentó deformaciones o en algunos casos el desarrollo se retardó (Imagen 8 C-F), lo que no pasa en la concentración de 0 y 3 (Imagen 8 A y B). En un inicio la mayor germinación de esporas fue a 6 mM, es importante mencionar que en el día 20 a esta misma concentración se observaron efectos de daño en la lámina protálica (Imagen 8 C). En cuanto a las concentraciones en las que el gametofito presentó deformaciones, hay algunas esporas que, si llegan a la forma cordiforme, por lo que se espera que estos generen esporofitos, en la Imagen 9 se puede observar

la aparición de gametofitos cordiformes en concentraciones de 9, 12 y 15 mM.

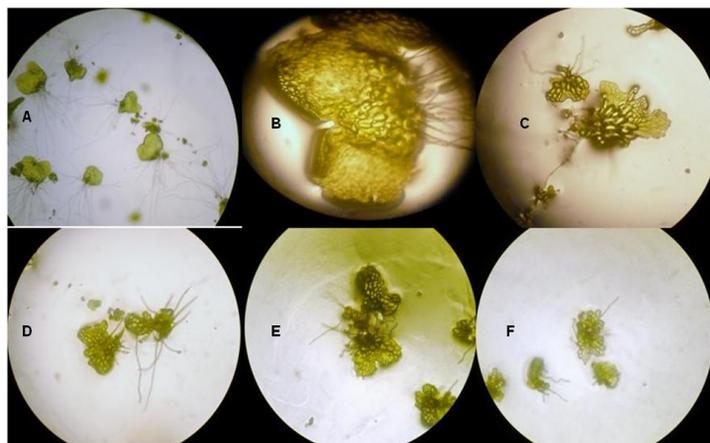


Imagen 81. Desarrollo de lámina protálica a los 20 días; A) 0 mM de Mn, B) 3 mM de Mn, C) 6 mM de Mn, D) 9 mM de Mn, E) 12 mM de Mn, F) 15 mM de Mn.

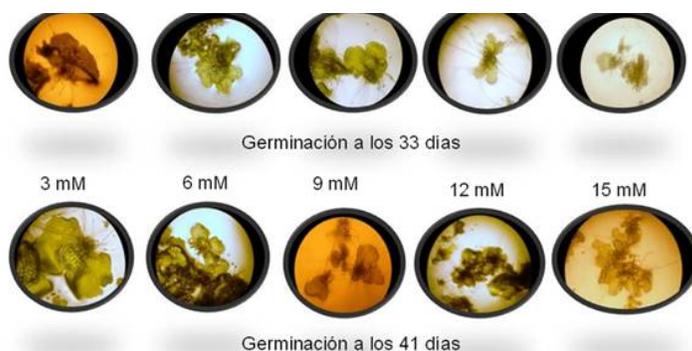


Imagen 9. Germinación de esporas en los días 33 y 41.

Al parecer los gametofitos que llegaron a desarrollar la forma cordiforme, darán lugar a esporofitos lo cual es importante, ya que en este estudio el principal interés fue obtener los esporofitos y no evaluar el daño.

CONCLUSIONES

Se estableció el ciclo de vida de *Thelypteris Kunthii*, esto es importante, ya que en la literatura éste no se encontraba reportado.

La concentración de 6 mM de Mn, provoca una aceleración en la germinación de *Thelypteris Kunthii*, ésta es considerada como fitotóxica.

BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, L.R., Stokey, A.G. 1964. Comparative morphology of the gametophyte of homosporous ferns. *Phytomorphology*. 14, 1, 51-70.
- Bidwell, S.D., Woodrow, I.E., Batianoff, G.N. 2002. Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus bidwilli* (Myrtaceae) from Queensland. *Australian Functional Plant Biology*. 29, 899-905.
- Cenni, E., Bussotti, F., Galeotti, L. 1998. The decline of a *Pinus nigra* Arn. reforestation stand on a limestone substrate: the role of nutritional factors examined by means of foliar diagnosis. *Annales Des Sciences Forestieres*. 55, 567-576.
- John, T.M. 1994. Ferns for American Gardens. Macmillan Publishing Company. USA. 70-75 pp.
- Jones, L.D. 1996. Encyclopedia of ferns. Timber press. USA. 142-147 pp.
- Juárez-Santillán, L. F., Lucho-Constantino, C. A., Vázquez-Rodríguez, G. A., Cerón-Ubilla, N. M. y Beltrán-Hernández, R. I. 2010. Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. *Bioresource Technology*. 101, 5836-5841.
- Liu, Y.G., Zhang, H.Z., Zeng, G.M., Huang, B.R., Li, X. 2006. Heavy metal accumulation in plants on Mn mine Tailings. *Pedosphere*. 16, 1, 131-136.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelly, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates. *Nature*. 409, 579-579.
- McGrath, S., Zhao, F. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 14, 277-282.
- Mickel, J.T., Beitel, J. 1998. Pteridophytes flora of Oaxaca, Mexico. Bot Gard. New York. 46, 1-568.
- Muñiz, M.E. 2005. Morfología de los gametofitos y esporofitos jóvenes de especies selectas del género *Thelypteris* subg. *Ciclorus* (Thelypteridaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15, 473- 497.

- Nayar B. K. y Kaur S. (1969) Types of prothallial development in homosporous ferns. *Phytomorphology*. 19, 2, 179-188.
- Peng, K., Luo, Ch., You, W., Lian, Ch. 2008. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator *Phytolacca americana* L. *J. Hazardous Materials*. 154, 674-681.
- Pérez, G.B., Riba, R., Jaramillo, R.I. 1995. Helechos mexicanos: Formas de crecimiento, hábitat y variantes edáficas. *Contactos*. 11, 22-27.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.H. 2000. Metal accumulating plants. En: Raskin I, Ensley Ed, editors. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley & Sons. New York, USA. 193-229.
- Reyes, J.I., Pérez, G.B., Mendoza, A. 1995. Plantas miniatura de la naturaleza: gametofitos de helechos. *Contactos*. 12, 5-10.
- Riba, R., Pérez, G.B., Mendoza, A., Jaramillo, R.I., 2000. Morfología de gametofitos y helechos. Universidad Autónoma Metropolitana (Ed.) México. pp. 1-20.
- Srivastava, M., Lena Q. Ma, Q.L., Jorge Antonio Gonzaga, S.J.A. 2006. Three new arsenic hyperaccumulating ferns. *Science of Total Environment*. 364, 24-31.
- Vara M., De Oliveira, H. 2003. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6, 285-321.
- Wei, C.Y., Chen, T.B. 2006. Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation. *Chemosphere*. 6, 1048-1053.
- Xu, X.H., Shi, J.Y., Chen, Y.X., Xue, S.G., Wu, B., Huang, Y.Y. 2006. An investigation of cellular distribution of manganese in hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb using SRXRF analysis. *Journal Environmental Science*. 4, 18, 746-751.
- Xue, S.G., Chen, Y.X., Reeves, R.D. 2004. Manganese uptake and accumulation by two populations of *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae). *J. Environmental. Pollution*. 131, 393-399.
- Yuan, M., Tie, B., Tang, M., Isao, A. 2007. Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Mineral Engineering*. 20, 188-190.