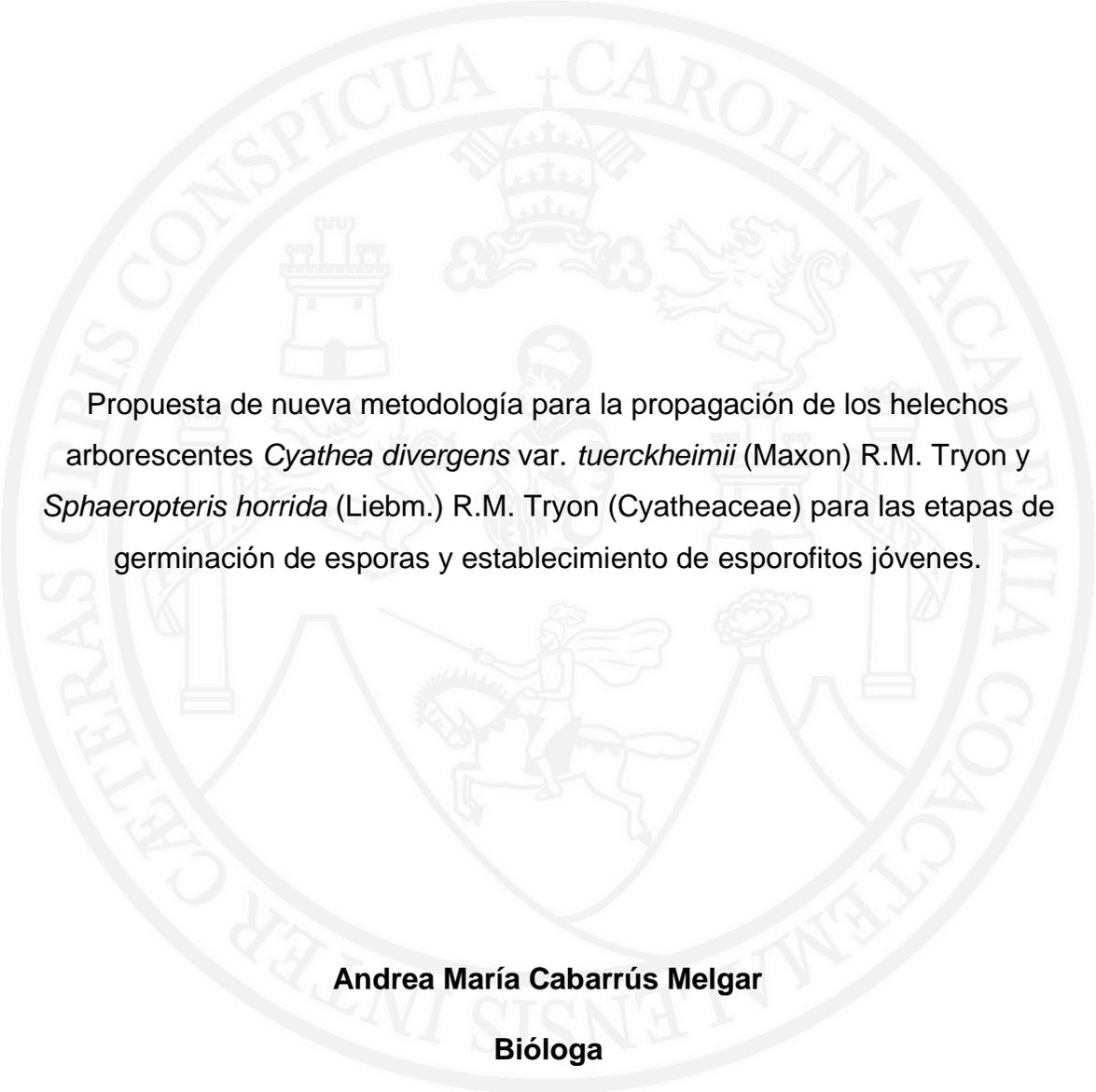


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Propuesta de nueva metodología para la propagación de los helechos arborescentes *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* (Maxon) R.M. Tryon y *Sphaeropteris horrida* (Liebm.) R.M. Tryon (Cyatheaceae) para las etapas de germinación de esporas y establecimiento de esporofitos jóvenes.

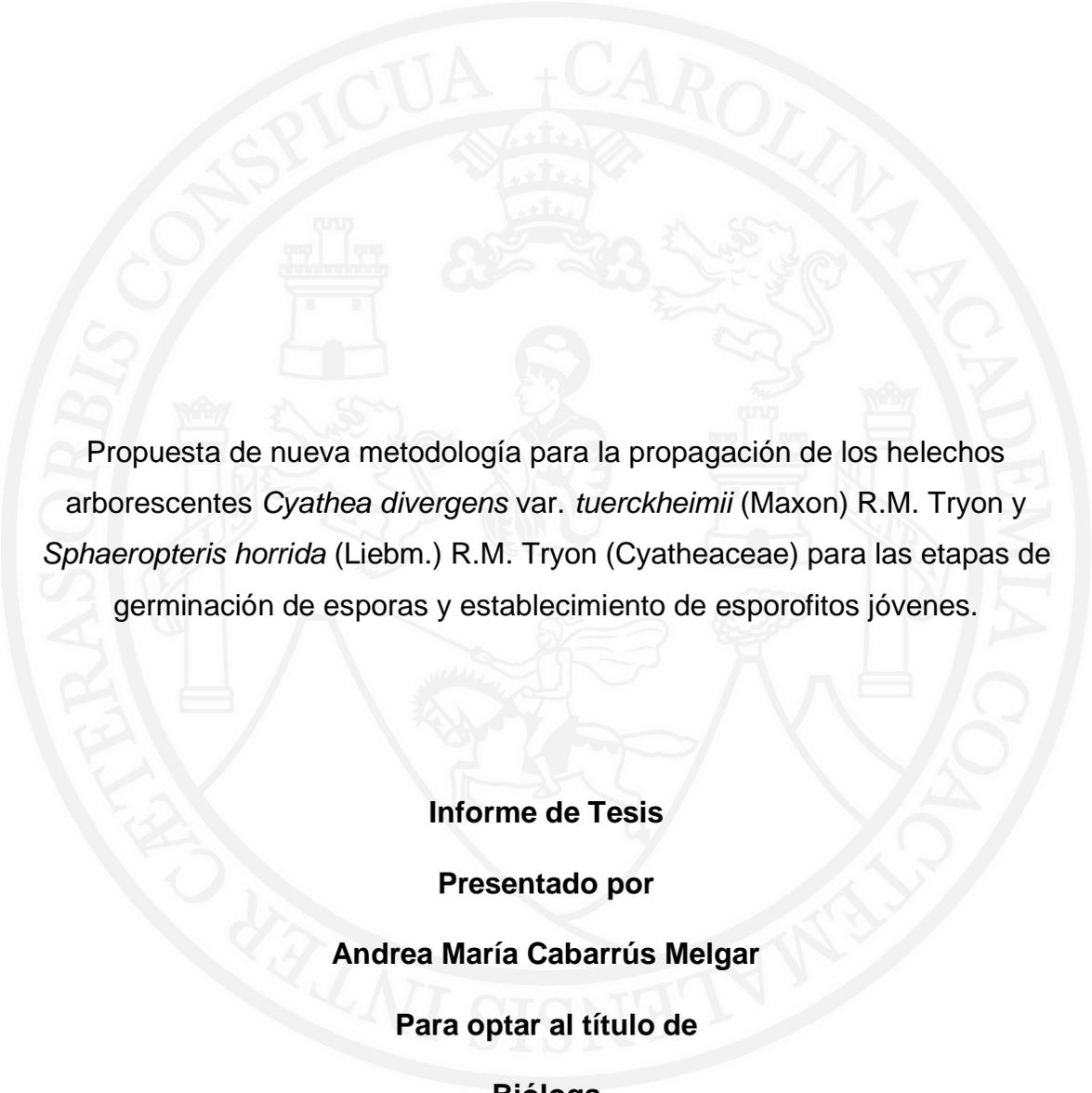
**Andrea María Cabarrús Melgar**

**Bióloga**

**Guatemala, abril 2021**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



Propuesta de nueva metodología para la propagación de los helechos arborescentes *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* (Maxon) R.M. Tryon y *Sphaeropteris horrida* (Liebm.) R.M. Tryon (Cyatheaceae) para las etapas de germinación de esporas y establecimiento de esporofitos jóvenes.

**Informe de Tesis**

**Presentado por**

**Andrea María Cabarrús Melgar**

**Para optar al título de**

**Bióloga**

**Guatemala, abril 2021**

## **JUNTA DIRECTIVA**

### **Facultad Ciencias Químicas y Farmacia**

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

## DEDICATORIA

Al bosque nuboso guatemalteco, junto a los musgos y helechos que esconde. Dedicaré mi vida a su comprensión, estudio y protección mientras me sea posible.

A mi familia porque aunque no entienden mi idioma, me dejaron secar pinos en el microondas, usar como secadora de herbario el baúl del carro en reiteradas ocasiones, tener un conejo en la refri por meses y generar cerca de cinco mil helechos (¿o más?) en el estudio, por mencionar algunos eventos extraordinarios, entre otras locuras, que fueron parte de este viaje llamado Biología.

A mi hermano por ser el apoyo incondicional ante esta aventura llamada VIDA.

A Rosel, por ser mentora, profesora, compañera, consuelo y consejera de vida. Sin ella mi amor por los musgos y los helechos no habría germinado en 2014.

Al Botánico Uwe Feldhoff, quien me inculcó un amor especial por las bromelias, las orquídeas y los helechos en 2017.

A la niña de 4 años que deseó toda la vida ser bióloga y botánica. Hoy puedo decirle, lo cumplimos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Armando Palomo y a doña Susy de Palomo, por permitirme iniciar el camino de la biotecnología. Sin ustedes, la biotecnóloga en mí, jamás se hubiera desarrollado.

A mi asesor Estuardo Archila y su familia. Por el acompañamiento en mi desarrollo personal y profesional en este camino de aprendizaje continuo. Y a mi revisor el Dr. Jorge Mario Vargas por ser mentor, profesor, jefe, compañero botánico y por coincidir en este camino llamado investigación científica.

A mis amigos de toda la vida: Emily, Carmen, Mónica, Sofi, Gerardo, Carlos, Julio, Karla, Pablo y Josh, por su hermandad desde que tengo memoria.

A mis compañeros y amigos universitarios. En especial a Sara, Papita, Bárbara, Checha, Peque, Nato, Lula, Emily y Alicia. Por compartir la experiencia de intentar hacer ciencia en este rincón del mundo llamado Guatemala. A Paula, por ser mi hermana a la distancia y en todo momento. A Cristian Méndez, por inyectarme siempre el entusiasmo de seguir cumpliendo mis sueños.

Al equipo de auxiliares de los años 2018-2019, por las pláticas en las graditas o en la gramita del T10. Mi experiencia jamás hubiera sido la misma sin esas charlas, almuerzos compartidos, catarsis, pasteles y risas. En especial a Jerry, porque su entusiasmo y locura hizo que compartir el cubículo del departamento de botánica fuera único.

A mis alumnos en mi recorrido como Auxiliar de Cátedra, por su paciencia, risas, giras, fotos y recuerdos. Por no dejar que me rindiera y por enseñarme tanto. Me llevo a buenos amigos de esa experiencia docente y espero haberles dejado por ahí algún trauma (amor) botánico.

Finalmente gracias a todos aquellos que me dijeron que no podría o que no debía ser bióloga. A los que me dijeron que me rindiera, por la limitación de mis piernas o por cualquier otra razón. Gracias a ellos el camino hasta el día de hoy fue cuesta arriba, pero la vista de esta victoria es más dulce y satisfactoria

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Jardín Botánico CECON-USAC y a Carol, por abrirme las puertas y dejarme ser mi mejor versión en todo momento.

A la Facultad de Agronomía USAC, por prestarme el laboratorio de CT en primera instancia y por abrirme un espacio desinteresado para mi formación en la biotecnología.

Al Grupo Tak Centroamérica, por permitirme usar sus instalaciones y recursos para la ejecución del segundo intento de la fase *in vitro* de este Proyecto de Tesis y por permitirme ejecutar mi EPS en su totalidad en sus instalaciones.

A todos los profesores de la Escuela de Biología, tanto los buenos como los malos. De los buenos aprendí a hacer ciencia. De los malos aprendí que no debo rendirme cuando las cosas se ponen difíciles, aprendí todo lo que no hay que hacer, y a que ningún cartón disfrazado de título universitario me hace superior ni inferior a nadie.

## Índice

1	Resumen .....	6
2	Introducción .....	8
3	Antecedentes .....	11
3.1	Polyodiidae: los helechos verdaderos .....	11
3.2	Descripción del ciclo de vida de los helechos.....	11
3.3	Morfología de un helecho.....	13
3.4	Las esporas y su viabilidad .....	16
3.5	Ecología de los helechos .....	17
3.6	Los Helechos arborescentes.....	19
3.7	Helechos arborescentes del Bosque Nuboso de Guatemala.....	20
3.7.1	Especies de interés para la investigación .....	21
3.8	Usos de los helechos .....	23
3.9	Métodos de propagación y conservación de helechos .....	24
3.9.1	Propagación convencional de helechos:.....	24
3.9.2	El cultivo <i>In vitro</i> : .....	25
3.9.3	El cultivo <i>in vitro</i> de helechos.....	30
3.9.4	Programas de conservación de helechos .....	32
3.10	Estudios realizados en Guatemala sobre helechos.....	35
4	Justificación.....	38
5	Objetivos .....	40
5.9	General .....	40
5.10	Específicos .....	40
6	Hipótesis.....	40

7	Diseño Experimental .....	40
7.9	Población .....	40
7.10	Muestra.....	41
7.11	Área de estudio.....	41
7.11.1	Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal .....	41
7.11.2	Reserva Natural Privada, Centro de Conservación ORQUIGONIA	42
7.12	Materiales .....	44
7.12.1	Materiales para la gira de campo .....	44
7.12.2	Materiales para el método de propagación convencional. ....	45
7.12.3	Materiales para el método nuevo de propagación propuesto.....	45
7.12.4	Materiales para el mantenimiento de los métodos de propagación convencional y la nueva metodología propuesta .....	46
7.12.5	Compuestos químicos necesarios para elaboración del Medio de cultivo M&S sin hormonas: .....	46
7.12.6	Insumos y equipo para la siembra <i>in vitro</i> .....	47
7.12.7	Cristalería para manejo de sustancias y soluciones .....	48
7.12.8	Material descartable para protocolo de desinfección de esporas... 48	
7.12.9	Material descartable para la siembra en campana .....	49
7.12.10	Materiales para el mantenimiento del cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	50
7.12.11	Materiales para limpieza y desinfección del cuarto de crecimiento	50
7.12.12	Material para la toma de datos de los tres métodos de propagación	50
7.12.13	Material para el procesamiento de datos .....	50
7.13	Métodos.....	51
7.13.1	Toma de muestras: .....	51

7.13.2	Diseño y propuesta de una nueva metodología.....	52
7.13.3	Protocolos de esterilización.....	54
7.13.4	Comparación de las metodologías de propagación de helechos ...	55
7.13.5	Validación de los métodos de germinación y establecimiento .....	57
7.14	Etapas de crecimiento .....	59
7.15	Eficacia de los métodos .....	60
7.15.1	Definición de eficacia:.....	60
7.16	Relación costo/beneficio .....	60
7.17	Inferencias en el posible uso de la nueva metodología .....	61
7.18	Análisis estadísticos.....	62
8	Resultados .....	64
8.9	Colectas.....	64
8.9.1	Biotopo para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera”: .....	64
8.9.2	Reserva Natural Privada: ORQUIGONIA.....	64
8.9.3	Esporas de las especies ornamentales para la validación .....	65
8.10	Esporas .....	67
8.11	Protocolos de Esterilización y Desinfección .....	69
8.11.1	Sustrato convencional .....	69
8.11.2	Sustrato Feldhoff .....	69
8.11.3	Medio de cultivo para siembra <i>in vitro</i> .....	69
8.12	Siembra .....	69
8.12.1	Siembra 1: Jardín Botánico .....	70
8.12.2	Siembra en la Facultad de Agronomía .....	73
8.13	Siembra en residencia particular.....	74

8.13.1	Convencional y nuevo método propuesto.....	75
8.14	Siembra in vitro en AGROSAK .....	76
8.15	Resultados de la desinfección de esporas .....	76
8.16	Resultados de la germinación y fenología.....	77
8.16.1	Porcentajes de germinación .....	77
8.16.2	Fenologías .....	79
8.16.3	Esporofitos obtenidos .....	83
8.17	Costos de los métodos y eficiencia .....	85
8.18	Proyección para posibles proyectos de conservación .....	86
9	Discusión.....	87
9.1	Colecta de esporas .....	87
9.2	Desinfección de las esporas .....	88
9.3	Siembra .....	92
9.4	Fenología y éxito en la germinación .....	93
9.4.1	<i>Cyathea divergens</i> var. <i>tuerckheimii</i> .....	94
9.4.2	<i>Sphaeropteris horrida</i> .....	95
9.5	Costos de producción .....	96
10	Conclusiones.....	100
11	Recomendaciones.....	100
12	Referencias .....	102
13	Anexos .....	115
13.1	Manuales de preparación de soluciones madre .....	115
13.1.1	Solución Madre 1: macroelementos (1000ml) .....	115
13.1.2	Solución madre de Cloruro de Cobalto (100ml) .....	115

13.1.3	Solución Madre 2: macroelementos y microelementos (1000ml) .	115
13.1.4	Solución Madre de Sulfato de Cobre (100ml) .....	116
13.1.5	Solución Madre 3: microelementos (1000ml).....	116
13.1.6	Solución Madre de Molibdato de de Sodio (100ml) .....	117
13.1.7	Solución madre 4: Microelementos (1000ml).....	117
13.1.8	Solución madre 5: Solución de Hierro (1000ml) .....	117
13.1.9	Solución madre de Vitaminas (500ml) .....	118
13.1.10	Solución de enmienda de pH: Hidróxido de Sodio [1M] (250ml) ..	118
13.1.11	Solución de enmienda de pH: Ácido Clorhídrico [1M] (250ml) ....	119
13.2	Manual de elaboración 1L de medio M&S sin hormonas .....	120
13.3	Costos completos de producción .....	120
13.3.1	Costos de la extracción de esporas.....	121
13.3.2	Costos de producción de 1 prueba en sustrato peat-moss preparado 122	
13.3.3	Costos de producción de 1 prueba con sustrato de sintético de tela 123	
13.3.4	Costos de producción de una prueba de siembra de esporas de 10 frascos <i>in vitro</i> .....	124
13.3.5	Costos de producción de subcultivos <i>in vitro</i> .....	126
13.3.6	Protocolos de desinfección evaluados:.....	128

## 1 Resumen

Los helechos son plantas vasculares que se caracterizan por su reproducción por medio de esporas. Tienen un ciclo de vida con alternancia de generaciones entre los gametofitos independientes ( $n$ ) y los esporofitos ( $2n$ ) que también son independientes. Lo anterior los diferencia tanto de las briofitas como de las plantas vasculares con semillas. Los helechos arborescentes están en especial peligro, ya que son organismos de crecimiento lento y su extracción de los bosques originarios del país ha colocado en riesgo las poblaciones locales. Esta investigación contrastó tres métodos diferentes de reproducción por medio de esporas: el método convencional con un sustrato de musgo de turba, *in vitro* utilizando el medio de cultivo Murashige & Skoog (M&S), y una nueva propuesta basada en sustituir el sustrato por uno sintético en base de algodón, fundamentado en el principio que establece que para la germinación las semillas y esporas sólo requieren agua.

Se encontró que, elementos como la humedad y la temperatura son claves para la exitosa reproducción de los helechos; sin embargo, la disponibilidad de nutrientes, junto a la disponibilidad de espacio fueron los factores limitantes para el desarrollo de los organismos durante las pruebas en los tres métodos evaluados.

El método propuesto se basó en el principio fundamental por el cual una semilla y una espora germinan: la disponibilidad de humedad para activar el metabolismo. Se logró una germinación inicial, sin embargo, los gametofitos jóvenes no sobrevivieron. Lo anterior puede explicarse a la disponibilidad de nutrientes en el medio, factor que sí estaba presente en los otros tratamientos experimentales. En total se obtuvo una germinación en los tres tratamientos, siendo el mejor método de germinación el *in vitro*, con porcentajes de hasta el 100 % de germinación por unidad experimental, seguido del método convencional con porcentajes máximos del 90 % por unidad de siembra, finalmente el método nuevo con un máximo del 40 % de germinación.

Aunque el método propuesto no fue exitoso en fases posteriores a la germinación, la fase experimental permitió evidenciar que los helechos arborescentes pueden ser

geminados y trabajados tanto en un medio de cultivo *in vitro* como en un medio convencional y uno sintético. La especie *Sphaeropteris horrida* es un helecho arborescente de crecimiento rápido y fácilmente cultivable siendo la especie con mejor rendimiento para los tres tratamientos evaluados y con un alto porcentaje de diferenciación en los métodos convencional y en laboratorio. *Cyathea divergens*, en cambio, es una especie más lenta, con etapas más largas y requerimientos específicos de cultivo, entre ellos, la disponibilidad de nutrientes, limitando los porcentajes de rendimiento durante la etapa experimental.

La evaluación de la eficiencia de los tres métodos permitió contrastar los costos de producción de las plantas obtenidas. El método nuevo no permitió a los organismos germinados sobrevivir, a pesar de añadir nutrientes al medio sintético después de la germinación. Durante las fases posteriores, el método convencional fue el más eficaz, tanto en costos, como en rendimiento del desarrollo de los organismos. Cuatro de las cinco especies evaluadas alcanzaron a diferenciarse en menos de 36 semanas después de la siembra, las últimas cuatro semanas fueron para la separación y aclimatación de los individuos obtenidos. El tratamiento *in vitro*, en cambio, no rindió en cuando a la relación costo/beneficio, ya que únicamente tres especies alcanzaron a diferenciarse en el tiempo de 40 semanas, lográndose muy pocos individuos a comparación del método convencional, a mayores costos.

## 2 Introducción

Los helechos son plantas vasculares que se caracterizan por su reproducción por medio de esporas (Escámez, 1989; Hoshizaki & Moran, 2001). Tienen un ciclo de vida con alternancia de generaciones entre los gametofitos independientes ( $n$ ) y los esporofitos ( $2n$ ) que también son independientes, esto los diferencia tanto de las briofitas como de las plantas vasculares con semillas (Christenhusz & Chase, 2014; Escámez, 1989; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). Todas las plantas conocidas como helechos pertenecen a la subclase Polypodiidae (Christenhusz & Chase, 2014; Smith et al., 2008). Existen unas 12,000 especies identificadas en todo el mundo, de las cuales en Guatemala se han identificado cerca de 782 (Christenhusz & Chase, 2014; Hoshizaki & Moran, 2001; Jiménez, 2009<sup>a</sup>; Véliz, 2008; Véliz & Vargas, 2006). De todas las especies conocidas en el país, se reportan en la actualidad 21 helechos arborescentes pertenecientes a 9 géneros en total (Véliz & Vargas, 2006).

Los helechos forman parte imprescindible de los ecosistemas, y son esenciales para los ciclos del agua, el nitrógeno, el carbono, entre otros (Jiménez, 2009<sup>b</sup>; Mehltreter, Walker, & Sharpe, 2010; Stadtmüller, 1987). Los helechos arborescentes están en especial peligro, ya que son organismos de crecimiento lento, y su extracción de los bosques originarios del país ha colocado en riesgo las poblaciones locales. Así Véliz y Vargas (2006), proponen que la extinción de los helechos arborescentes del territorio nacional podría surgir a partir de tres actividades humanas: el cambio de uso del suelo, la compraventa de los raquis y raíces a nivel internacional, y el comercio de los productos y derivados a nivel local. La cosecha masiva de las masas de raíces surge a la demanda de los viveros y extractores de epífitas, sobre todo de orquídeas y bromelias (Véliz & Vargas, 2006). La conservación *ex situ* de los helechos ha sido practicada utilizando varias técnicas: reproducción por esporas, reproducción vegetativa y reproducción *in vitro* (Barros, Salinero, Vela, & Sainz, 2008; Jiménez, 2012<sup>b</sup>; López-Romero, Riaño, & Briones, 2016; Ruiz, 1995).

La siembra convencional de esporas consiste en su dispersión en un medio controlado. Generalmente se utilizan cajas de cultivo de diferentes dimensiones, que contengan algún sustrato que sea capaz de guardar la humedad necesaria. El sustrato más utilizado para este método es musgo de turba con perlita y vermiculita en diferentes proporciones, a un pH entre 5.5 y 6.5 (Barros, Salinero, Vela, & Sainz, 2008; Bernabe, WilliaM&S-Linera, & Palacios-Rios, 1999; WilliaM&S-Linera, & Palacios-Rios, 1999 ).

El otro método de propagación por esporas es por cultivo *in vitro* por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales (CT). El CT maneja condiciones estrictas de laboratorio: una campana de flujo laminar para la transferencia de los tejidos vegetales, en condiciones completamente controladas y asépticas. El sembrador utiliza un medio de cultivo nutritivo, donde se colocan los cultivos deseados en contenedores (variables) ya estériles y, en condiciones de laboratorio, se almacenan hasta la germinación, formación de las plántulas y posterior establecimiento (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993; Portillo, 2002). Aunque es un método exitoso de propagación para casi cualquier tipo de organismo vegetal, el costo es alto. Se requiere de equipo especial con personas capacitadas y condiciones de laboratorio controladas hasta que se formen los organismos y se desarrollen lo suficiente para la fase de adaptación (Barros et al., 2008). Además se requiere de una etapa de endurecimiento de los organismos *ex vitro*, ya que si se exponen a condiciones de campo, los organismos raramente sobreviven sin una etapa de adaptación previa (Barros et al., 2008; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993; Portillo, 2002).

El método propuesto en esta investigación fue una modificación del método utilizado por el botánico alemán Uwe Martin Herbert Feldhoff Böhm para la propagación de bromelias y orquídeas que su empresa, Claveles del Aire, S.A., exporta. La técnica consiste en sustituir el sustrato común por un medio sintético, como sería un lienzo de tela o de algodón. Lo anterior se basa en un principio básico para la germinación de semillas y esporas, el cual establece que para la germinación únicamente se

necesita humedad, esto es para romper la latencia inicial, denominada fase I (Azcon-bieto & Talón, n.d.; Campbell & Reece, 2007; Escaso, Martínez, & Planello, 2010).

Se contrastaron los tres métodos: convencional, *in vitro* y la modificación del método Feldhoff. Se evaluó la eficacia por medio de la relación costo / beneficio de cada método, tomando en cuenta cada uno de los gastos en que se incurrió durante la realización del experimento. Diseñar, establecer y validar una metodología de propagación, que sea económicamente viable y que pueda aplicarse para todo tipo de helechos, es el primer paso hacia la posible inserción de estos organismos y la recuperación de las poblaciones nativas en los bosques nubosos de Guatemala.

### **3 Antecedentes**

#### **3.1 Polypodiidae: los helechos verdaderos**

Todo lo contenido en Monilophyta ha estado en discusión durante mucho tiempo. Los grupos cercanos a los helechos (en inglés *Fern allies*) tienen en común que son plantas vasculares, que producen esporas pero que no son considerados helechos *per se* (Christenhusz & Chase, 2014; Escámez, 1989; Judd, Campbell, Kellogg, Stevens, & Donoghue, 2016; Smith et al., 2008). Christenhusz & Chase, (2014) hicieron una revisión de la historia de la clasificación de los helechos y los grupos más cercanos a estos, desde la publicación de Tryon (1952) hasta la actualidad, basados en los últimos estudios, llegaron a la conclusión que los grupos actualmente aceptados son: Phylum Lycopodiophyta, conteniendo a las subclases Lycopodiidae: que contiene a los órdenes: Lycopodiales -Licopodios-, Selaginellales -Selaginellas- y Isoëtales -Isoëtes-. Y el Phylum Polypodiophyta, donde se encuentran las subclases: Equisetidae -Equisetos-, Ophioglossidae -con dos órdenes: Ophioglossales y Psilotales-, Marattiidae (con un único orden y una única familia Marattiales y Marattiaceae respectivamente), estos corresponden a los organismos Eusporangiados y Polypodiidae, donde están agrupados los helechos verdaderos Leptosporangiados. Existen cerca de 12,000 especies de helechos identificadas en todo el mundo, de las cuales se han identificado entre 680 y 782 en Guatemala (Christenhusz & Chase, 2014; Hoshizaki & Moran, 2001; Jiménez, 2009b; Smith et al., 2008; Véliz, 2008; Véliz & Vargas, 2006).

#### **3.2 Descripción del ciclo de vida de los helechos**

Los helechos son plantas vasculares que se caracterizan por su reproducción por medio de esporas (Campbell & Reece, 2007; Escámez, 1989; Hoshizaki & Moran, 2001) y un ciclo de vida con alternancia de generaciones entre los gametofitos independientes (n) y los esporofitos (2n) igualmente independientes, esto los diferencia tanto de las briofitas, cuyo esporofito es dependiente del gametofito y de

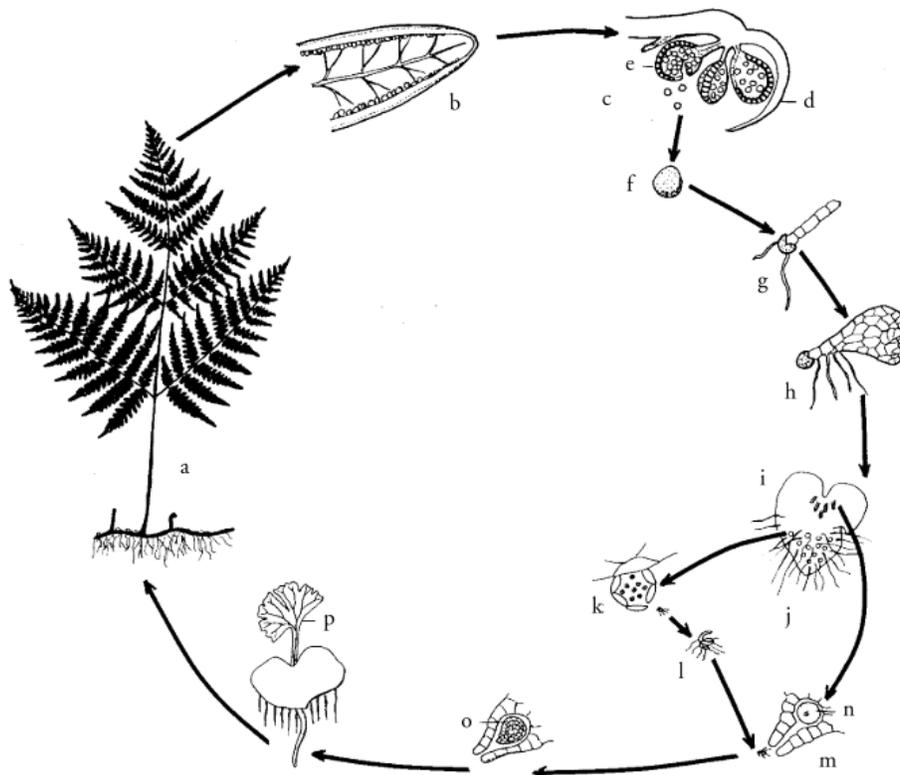
las plantas vasculares con semillas, cuyos gametofitos son dependientes de los esporofitos (Christenhusz & Chase, 2014; Escámez, 1989; Muñiz Díaz De León, Mendoza-Ruiz, & Pérez-García, 2005; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). Los helechos dependen del agua en casi todo su ciclo de vida, suelen crecer en lugares con alta disponibilidad de agua. En caso de aquellos que se desarrollan en lugares con poca humedad, la fenología se adapta para que la generación de gametofitos, y la posterior producción de gametos coincida con la época lluviosa, ya que los gametos masculinos son móviles y requieren una película de agua para nadar hasta los gametos femeninos para que ocurra la fecundación (Hoshizaki & Moran, 2001). Otra manera de adaptar el ciclo de vida es por medio del depósito de un banco de esporas, similar al banco de semillas, del cual surgirán los individuos en cuanto las condiciones sean favorables (Mehltreter et al., 2010).

El ciclo de vida comienza con una espora. La espora germina y da origen a la estructura conocida como gametofito (n) (Campbell & Reece, 2007; Hoshizaki & Moran, 2001; Mehltreter et al., 2010). La germinación de las esporas se activa, en la mayoría de los casos, por una combinación de la exposición a la humedad, exposición a la luz y a veces se ve influenciada por exposición a hormonas de otros gametofitos ya desarrollados, que pueden inhibir o favorecer el desarrollo de más individuos (Mehltreter et al., 2010; Ospina, Briones, & Pérez-García, 2015). La exposición de la espora al espectro de luz del rojo y del rojo lejano inicia los procesos fisiológicos necesarios para la germinación (Mehltreter, 2008; Ranker & Haufler, 2008). Los helechos pueden ser heterospóricos, lo que significa que desde la generación de esporas, hay dos tipos: los que dan origen a los gametofitos masculinos y a los femeninos, y que ambos tipos de esporas son diferentes, condición común en los helechos acuáticos; o bien pueden ser homospóricos, es decir que todas las esporas son equivalentes, por lo cual son potencialmente bisexuales, y son los factores, en su mayoría exógenos, los que afectan la expresión de los sexos y posterior generación de gametos, que es la condición común para los helechos terrestres (Mehltreter et al., 2010).

Una vez se desarrollan los gametofitos, maduran e inician la producción de gametos. El gameto masculino es una célula móvil, la cual necesita una película de agua para poder alcanzar a la ovocélula, que permanece inserta en el gametofito femenino. Una vez ocurre la fecundación se forma el cigoto ( $2n$ ), seguido por un embrión que posteriormente será un esporofito (Campbell & Reece, 2007; Ranker & Haufler, 2008; Schneider, 2012). Una vez formado el esporofito, se tiene una fase juvenil e inmadura, durante la cual el helecho crece y se desarrolla, pero sin formar ninguna estructura productora de esporas, en esta fase los frondes que suelen desarrollarse presentan diferencias morfológicas con los frondes adultos (Barros et al., 2008; Hoshizaki & Moran, 2001; Mehlreter et al., 2010). Una vez alcanzada la madurez del organismo y ya establecida la formación de frondes adultos, se comienzan a tener esporangios, agrupados en soros, y estos se agrupan en patrones diferenciados (Campbell & Reece, 2007; Hoshizaki & Moran, 2001). Dentro de los esporangios ocurre la esporogénesis, la vía productora de esporas, para que luego de madurar sean liberadas y así de inicio el ciclo de un nuevo organismo (Ranker & Haufler, 2008). En la figura 1 se observa un esquema del ciclo de vida de un helecho.

### **3.3 Morfología de un helecho**

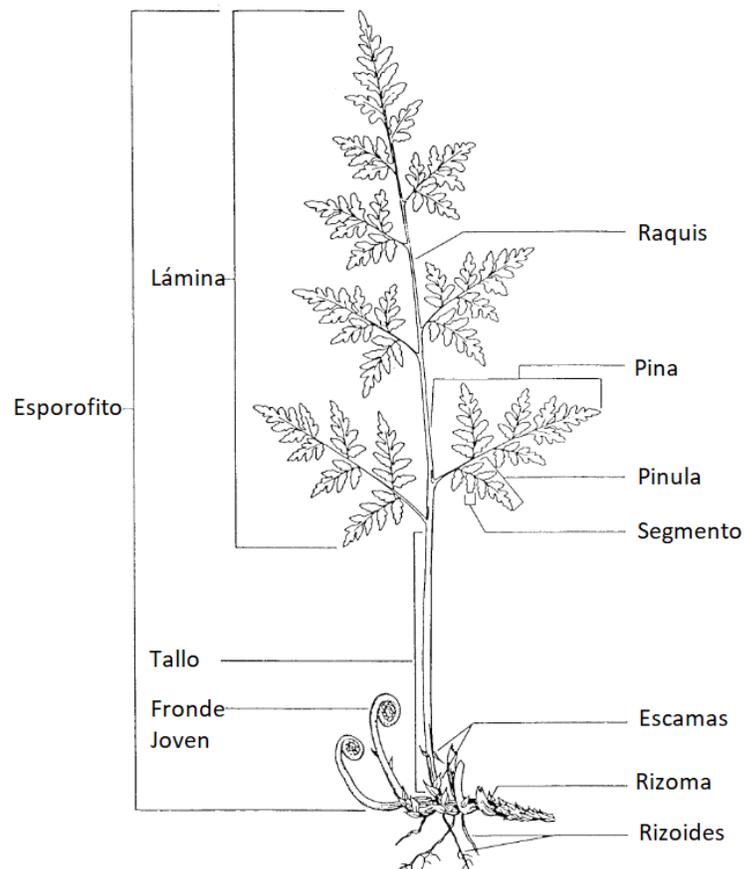
Como ya se mencionó, los helechos constan de dos fases: una gametofítica ( $n$ ) y una esporofítica ( $2n$ ). El gametofito es un organismo independiente, reducido, inconspicuo, generalmente en forma cordada, uniestratificado, con un solo sexo, y algunas veces hermafrodita; mientras que el esporofito es una planta también independiente, conspicuo, de morfologías y tamaños variados (Hoshizaki & Moran, 2001). En la figura 2 se observa la morfología general de un helecho en fase esporofítica.



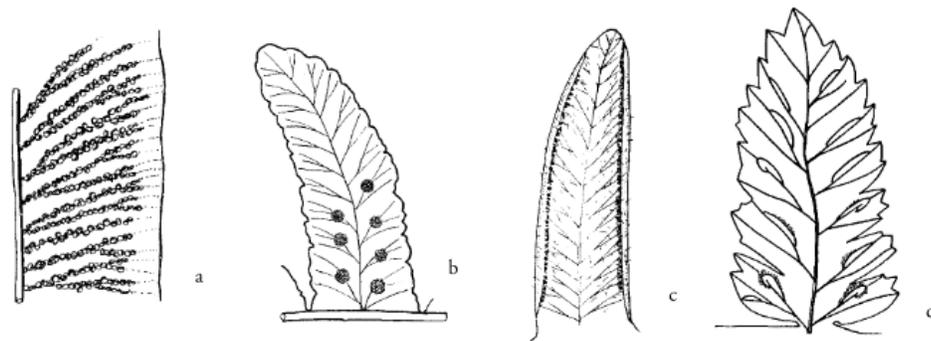
**Figura 1. Ciclo de vida de un helecho.** a. Esporofito maduro; b. pinna madura con soros; c. Soro; d. Indusio; e. Esporangio con su anillo oblicuo aperturándose; f. espora; g. Germinación de la espora; h. Gametofito o Prótalo; i. Gametofito o prótalo maduro -vista abaxial-; j. rizoides del Gametofito; k. Anteridio -estructuras masculinas-; l. Anterozoos o Gametos Masculinos; m. Arquegonio -estructura femenina-; n. ovocélula; o. Embrión -2n-; p. Esporofito joven. Adaptado de Hoshizaki & Moran, (2001).

La morfología general de un helecho en su fase de esporofito consta de: rizoides, rizoma, raquis, peciolo y frondes. Esta estructura simple asemeja la estructura de una planta vascular con semillas donde hay una raíz, un tallo u eje central y hojas (Campbell & Reece, 2007; Hoshizaki & Moran, 2001; Jiménez, 2009b). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que esta morfología es análoga mas no equivalente; lo anterior se basa en la idea darwiniana de evolución, en donde una estructura es comparable con otra que cumple la misma función, aunque no sean iguales. En el caso de los helechos no podemos hablar de hojas, tallos y raíces, puesto que es difícil diferenciar dónde termina una sección y empieza la siguiente,

además que su origen y función no son las mismas (Schneider, 2012). En la parte abaxial de los frondes maduros suelen hallarse las estructuras reproductivas llamadas esporangios, que se agrupan en estructuras denominadas soros. Los soros pueden o no estar protegidos por estructuras conocidas como indusios, que cumplen la función de protección (Campbell & Reece, 2007; Jiménez, 2009b; Mehlreter et al., 2010; Schneider, 2012). En la figura 3 se observan algunos ejemplos de la disposición de los soros.



**Figura 2. Esquema general de un esporofito de helecho.** Se observa la morfología de un helecho de lámina compuesta, la más común en los helechos. En este caso el rizoma es cortamente crepitante y cuenta con escamas como indumento, al igual que la base del tallo. Adaptado de Hoshizaki & Moran, (2001).



**Figura 3. Ejemplos de algunas disposiciones de soros.** Se observan algunas disposiciones comunes de soros: a. a lo largo de las venas (*Aspleniaceae*); b. redondos en los vértices de las venas (*Polypodiaceae*); c. lineares y marginales (*Pteridaceae*); d. reniformes mediales con indusio (*Pteridaceae*). Adaptado de Hoshizaki & Moran, (2001).

### 3.4 Las esporas y su viabilidad

Son estructuras unicelulares que cuentan con una pared protectora del contenido y que miden menos de 100 micras (Hoshizaki & Moran, 2001; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). Un único helecho adulto produce una inmensa cantidad de esporas durante toda su vida, se ha establecido el parámetro que en un solo gramo de esporas hay en promedio 300 millones de ellas (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). Por otro lado, las esporas tienen un tiempo de vida útil. Esta viabilidad varía entre especies y también se ve afectada por las condiciones intrínsecas como lo son la especie, edad, tiempo de latencia; y por condiciones extrínsecas, como las condiciones ambientales, condiciones del suelo, humedad, pH, fotoperiodo, condiciones de almacenamiento, entre otros. (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993; Schneider, 2012).

La mayoría de los helechos presentan una germinación que oscila entre 4 hasta 210 días, y la viabilidad reportada es de unos 3 años en promedio en helechos no arborescentes (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). En la mayoría de los helechos tropicales se observan esporas del tipo no clorofítico, es decir que su

viabilidad es mucho mayor, pero la tasa de germinación es mucho más lenta, esto ocurre porque estas esporas están en latencia por lo que caen al banco de esporas y semillas del suelo donde permanecerán el tiempo necesario hasta que las condiciones sean adecuadas (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993).

### **3.5 Ecología de los helechos**

Los helechos forman parte esencial de los ecosistemas, y dentro de los bosques que habitan, junto con otras plantas epífitas, son esenciales para los ciclos del agua, (sobre todo en bosques nubosos con alta presencia de lluvia horizontal), nitrógeno, fósforo, carbono y otros compuestos (Jiménez, 2009b; Mehltreter et al., 2010; Stadtmüller, 1987). Muchos helechos, junto a briofitas y líquenes, son pioneros o habitan en ambientes abiertos, sobre todo en trópicos y subtrópicos; además influyen en la dinámica de la germinación de semillas y esporas, así como la adaptación de otras especies (Mehlreter et al., 2010). Los helechos son ecológicamente importantes en el sotobosque del cual son parte. Los helechos en bosques nubosos se han utilizado, entre otras cosas, como indicadores de cambio ambiental, diversidad biológica, cambio de uso de suelo, entre otros (Jiménez, 2009b; Myers, 1969; Stadtmüller, 1987).

En los trópicos, la mayor diversidad de flora y fauna se da en las regiones montañosas y esto puede explicarse ya que las montañas cuentan con una gran variedad de diferentes hábitats, diferentes suelos, temperaturas, microclimas, rangos de humedad, exposición a la luz, etc. (Chaverri-Polini, 1998; Stadtmüller, 1987). Esto favorece tanto la diversidad como los endemismos (Chaverri-Polini, 1998). En cuanto a las comunidades de plantas, lo anterior ha generado muchas adaptaciones tanto morfológicas como fisiológicas, para la colonización de los micrositos donde se desarrollan ya que las condiciones climáticas, en especial la temperatura y la lluvia, se consideran como los dos factores más importantes en la distribución de los helechos (Brownsey, 2001; Chaverri-Polini, 1998; Page, 2002). Para los helechos arborescentes no es la excepción, se sabe que se pueden

desarrollar en ambientes con dosel tupido, donde suelen crecer y superar la barrera natural. También son competidores importantes en recursos como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Mehltreter et al., 2010). La persistencia de los helechos en un lugar sólo es posible si los nichos realizados de las fases de desarrollo coinciden: esporas, gametofitos y esporofitos. Así esto se debe también cumplir con la obtención de los recursos requeridos en las fases de gametofitos y esporofitos jóvenes y esporofitos ya maduros. Los requerimientos en estas fases son diferentes y esto debe tomarse en cuenta para el desarrollo de cualquier helecho (Page, 2002).

La ecología de los gametofitos es muy difícil de trabajar, identificar y de incorporar a estudios de ecología en general, se conoce más sobre los gametofitos y su desarrollo por medio de estudios de cultivo *ex situ* (Mehltreter et al., 2010). Los gametofitos, se considera, que están más adaptados a ambientes más variados que los esporofitos. Se ha demostrado que la plasticidad de los gametofitos es importante para la distribución, desarrollo y establecimiento de los futuros esporofitos (Greer, Lloyd, & McCarthy, 1997). La plasticidad de los gametofitos puede radicar a que sus requerimientos son más bajos, sobre todo por su pequeño tamaño y baja tasa fotosintética, lo que les permite desarrollarse en ambientes con poca luz (Farrar, 1998). Así mismo, caso contrario, los esporofitos están más restringidos a nichos más estables (Greer et al., 1997). Se sabe que la disponibilidad de recursos es un factor de mucha importancia para el éxito del establecimiento de gametofitos, y de las posteriores etapas de desarrollo (Grime, 1985). Durante la fase de gametofitos los helechos también compiten con sus vecinos (Grime, 1985; Rünk & Zobel, 2009).

En cuanto a los esporofitos el éxito del establecimiento depende del éxito previo de los gametofitos (Barros et al., 2008; Grime, 1985). Si bien los gametofitos son la fase más numerosa del ciclo de vida de los helechos, después de las esporas, también son la base de dónde y en qué condiciones se va a desarrollar el esporofito posteriormente, sin embargo, no quiere decir que este lugar sea el óptimo para el

desarrollo de un esporofito adulto a futuro (Page, 2002). Se cree que los helechos sólo crecen en bosques húmedos, establecidos y poco perturbados, sin embargo, son organismos clave en la sucesión vegetal, también crecen en ambientes perturbados, riscos, ambientes xerófitos, expuestos directamente a la luz o por el contrario en lugares a penas con incidencia de luz, etc. (Mehltreter et al., 2010).

### **3.6 Los Helechos arborescentes**

Entre los helechos verdaderos se haya el Orden Cyatheales (Christenhusz & Chase, 2014). Este Orden se considera el segundo grupo más diverso de helechos, conteniendo al menos 8 familias, 13 géneros y unas 660 especies alrededor del mundo (Christenhusz & Chase, 2014; Judd et al., 2016; Korall, Conant, Metzgar, Schneider, & Pryer, 2007). La historia del grupo data del carbonífero, época en la que los helechos conformaban la mayoría de la vegetación (Christenhusz & Chase, 2014; Smith et al., 2008). La mayoría de estos helechos son conocidos como helechos arborescentes debido a su porte y forma de crecimiento. Se han reportado plantas de más de veinte metros de altura y frondes de más de dos metros de largo. Una sinapomorfía del grupo es el anillo helicoidal completo del esporangio a diferencia del anillo interrumpido por el pie del orden Polypodiales. Estos helechos se distribuyen en los trópicos, sobre todo en bosques nubosos, pluviales, o montanos (Christenhusz & Chase, 2014). En los trópicos se conocen unas 645 especies de helechos arborescentes, y de estos al menos el 90% pertenecen a las familias Cyatheaceae y Dicksoniaceae (Christenhusz & Chase, 2014; Véliz & Vargas, 2006). En Guatemala se reportan 21 especies de helechos arborescentes, distribuidos en 9 géneros, entre los cuales se incluyen 3 pertenecientes al género *Marattia* que se clasifica dentro de la subclase Marattiidae (Véliz & Vargas, 2006).

### **3.7 Helechos arborescentes del Bosque Nuboso de Guatemala**

Véliz & Vargas, (2006) distinguieron cuatro áreas de distribución de grupos de helechos arborescentes: los de bosques nublados en el Arco Húmedo del Norte, los de tierras bajas en el Arco Húmedo del Norte, los de bosques nublados en el Arco Húmedo del Sur y los de tierras bajas en el Arco Húmedo del Sur. Según Stadtmüller (1987) el Bosque Nuboso se caracteriza por la presencia frecuente de viento nuboso y una composición vegetal junto a condiciones atmosféricas especiales. La constante neblina deriva de la humedad resultante que se condensa en la superficie de la vegetación goteando y escurriendo por los troncos, a este fenómeno se le conoce como lluvia horizontal (Bruijnzeel, Kappelle, Mulligan, & Scatena, 2011; Stadtmüller, 1987).

El bosque nuboso puede estar entre los 500 msnm a los 3,500 msnm, con una mayor ocurrencia entre los 1,200 msnm a los 2,500 msnm y cuya composición vegetal es particularmente compleja (Bruijnzeel et al., 2011; Stadtmüller, 1987). En Mesoamérica se reportaron en 1976 únicamente 1,600 km<sup>2</sup> de bosques nubosos localizados desde México a Panamá. En Guatemala este bioma está representado en varias regiones: Los Cuchumatanes, la Sierra Madre y la Cadena Volcánica, en las montañas de las Verapaces; en la Sierra de las Minas desde el Cerro Quisis hasta Cerro Verde en Zacapa; también en la zona de Trifinio y Sierra El Merendón y finalmente una única región aislada en las montañas El Mico en Izabal (Ávila, Pérez, Cajas, & Morales, 2006; Stadtmüller, 1987). Geográficamente, el bosque nuboso representa sólo un 0.24% de la cobertura Nacional dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (CECON, 1999). El bosque nuboso no es un continuo, sino se puede interpretar como un sistema de islas que en conjunto manejan ciertas condiciones y ensamblajes de especies en común (Chaverri-Polini, 1998; Véliz & Vargas, 2006).

### 3.7.1 Especies de interés para la investigación

- *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii*

Conocido como “Chipe negro”. Este helecho terrestre forma una masa de textura gruesa y abundante con sus raíces entretejas y densas. Crece entre los 1,500 y los 2,500 msnm (Eleutério & Pérez-Salicrup, 2009; Véliz & Vargas, 2006). Alcanzan hasta 12 m de altura; frondes de hasta 4 m de largo, peciolos de ligera a fuertemente espinosos; láminas bipinnadas-pinnatífidas, pinnas pediceladas; soros mediales, indusio globoso (Véliz & Vargas, 2006). En la figura 4 se observan el hábito, los indusios y el porte de los frondes.

*Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* ha sido trabajado en México con fines de conservación por Eleutério & Pérez-Salicrup, (2009), en ese caso se hicieron trasplantes de helechos jóvenes que estaban en los bordes del camino, como una medida sustitutiva al cultivo desde esporas debido a los costos y tiempo de producción. Mientras que Ospina y colaboradores, (2015) cultivaron este y otros helechos arborescentes desde las esporas teniendo buenos resultados de germinación dentro de los primeros 30 días después de la siembra. Se sabe que los esporofitos jóvenes y adultos se desarrollan mejor en condiciones de media sombra y sombra (Briones & Riaño, 2014).

- *Sphaeropteris horrida*

Conocido como “Chipe canche”. Este helecho puede alcanzar los 15 metros de altura. Las raíces forman una masa muy abundante de consistencia dura, de coloración parda oscura. Los frondes pueden ser desde 1m hasta 5m de largo; pecíolo grueso, inerme, moreno claro a oscuro, la base densamente escamosa, las escamas 1-4 cm, pajizas a moreno oscuro; lámina 2-pinnado-pinnatífida a 3-pinnada; raquis y costas escamosos abaxialmente, las escamas pajizas a moreno-rojizas, con dientes marginales; indusio por lo común en forma de urna o de copa

profunda (Véliz & Vargas, 2006). En la figura 5 se observan el porte de un *S. horrida* adulto y porte de un fronde maduro.



**Figura 4.** *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii*. Izquierda: hábito arborescente. Individuo de 10m de altura localizado en el Biotopo para la conservación del Quetzal en el sendero “Los Helechos”. Derecha superior: indusios globosos de un fronde maduro, aumento 40x. Derecha inferior: fronde de 2.05 metros en comparación con una persona de 1.62m de altura. La línea blanca indica el porte del fronde en su totalidad. Datos obtenidos en campo en diciembre de 2018, y julio 2019 y en laboratorio en mayo del 2019.

Es uno de los helechos de mayor interés económico, utilizado como ornamental debido a su fácil crecimiento en comparación con otros helechos arborescentes de crecimiento más lento. La masa de raíces es utilizada para elaboración de macetas y artesanías. Crece entre los 600 y los 2,000 msnm (Véliz & Vargas, 2006). En la Enciclopedia de los Helechos de Jardín de Olsen, (2007), menciona el interés de este helecho en la jardinería y paisajismo de Europa, una razón por la cual el interés en estos organismos ha ido en aumento. Bernabé y colaboradores, (1999), trabajaron la germinación de esporas de tres especies de helechos arborescentes, incluida *S. horrida*, aunque no tuvieron éxito en la germinación de las esporas, trabajaron con trasplantes de individuos jóvenes extraídos del bosque. Encontraron

que este helecho se desarrolla en ambientes semi abiertos, y no tanto en bosque interior o de sombra.



**Figura 5.** *Sphaeropteris horrida*. Izquierda: porte de un organismo maduro de unos 15 años. Altura aproximada de 5.5m. Derecha: porte de un fronde maduro de 2.6m de largo. En comparación con una persona de 1.62m de altura, la línea negra indica el porte del fronde en su totalidad. Localizados en el inicio del sendero interpretativo de la reserva Orquigonia. Datos obtenidos en campo en julio 2019.

### **3.8 Usos de los helechos**

Los helechos han sido utilizados con diferentes intenciones alrededor del mundo. Muñiz Díaz De León, Mendoza-Ruíz, & Pérez-García, (2005) reportan que se les ha dado importancia ornamental, medicinal, alimenticio, en horticultura como medios de siembra o elementos en la jardinería y paisajismo, por su fijación de nitrógeno

para la elaboración de fertilizantes naturales, construcción y elaboración de tintes naturales.

En Guatemala específicamente, por tradición, es la región de las Verapaces donde se le ha dado mayor uso a los helechos arborescentes. Se destaca su uso como fuentes de alimento, como estructuras de construcción (vigas principalmente), para la elaboración de artesanías, horticultura y como ornamento (Véliz & Vargas, 2006).

Al ser organismos de crecimiento lento, su extracción de los bosques originarios ha colocado en riesgo las poblaciones. Véliz y Vargas (2006), proponen que la extinción de los helechos arborescentes en el país podría surgir a partir de tres actividades humanas: el cambio de usos de suelo que amenaza los ecosistemas donde se desarrollan; la compraventa de los tallos y raíces a nivel internacional; y el comercio de los productos y derivados a nivel local. La cosecha masiva de las masas de rizomas surge a la demanda de los viveros y extractores de epífitas, sobre todo de orquídeas y bromelias (Véliz & Vargas, 2006), esta demanda se da porque ofrecen buen drenaje y aireación, características de un buen sustrato, por lo cual las masas de rizomas son populares entre los cultivadores y coleccionistas de orquídeas y bromelias, tanto a nivel nacional como internacional (Myers, 1969; Stadtmüller, 1987; Véliz & Vargas, 2006).

### **3.9 Métodos de propagación y conservación de helechos**

#### **3.9.1 Propagación convencional de helechos:**

El método consiste en sembrar las esporas en un medio controlado (Barros et al., 2008). Se preparan cajas de cultivo, que pueden ser cajas Petri, bandejas de duroport o cualquier material aislante, ya sea con tapadera o bien que puedan taparse con plástico para cubrir alimentos o bolsas plásticas traslúcidas. Tapar el cultivo es fundamental ya que aísla a las esporas de interés de cualquier factor exógeno y evita la pérdida de la humedad (Barros et al., 2008; Bernabe et al., 1999). El medio más común para la reproducción de helechos es una mezcla de musgo de

turba con perlita y vermiculita; esta mezcla se considera ideal por la retención de agua del musgo de turba, la aireación y ventilación que ofrecen la perlita y la vermiculita, así mismo la vermiculita posee micronutrientes que ayudan a los cultivos a desarrollarse de mejor manera (The American Horticulture Society, 1999).

Barros, y colaboradores (2008), utilizaron para propagar tanto helechos ornamentales (tres especies del género *Cyathea*, una del género *Pteris* y *Asplenium nidus*) como un helecho nativo amenazado (*Pteris incompleta*). Ellos sembraron en tres tratamientos diferentes consistentes en un sustrato de musgo de turba y perlita a un pH de 6, un sustrato de musgo de turba con perlita con un pH de 4 y finalmente sustrato de arena de río. Controlaron el fotoperiodo a 16 horas y una temperatura promedio de 20-23°C. Se llevó a cabo el experimento por 6 meses, tiempo en el cual las especies elegidas se desarrollaron con éxito (Barros et al., 2008).

Se ha establecido que una vez germinadas las esporas se observan puntos verdes, esta es la fase inicial de desarrollo. La segunda fase consiste en observar los prótalos o gametofitos, estructuras uniestratificadas que son distinguibles a simple vista y que formarán los gametos (Gabriel y Galán, Prada, & Rolleri, 2008; Raven, Evert, & Eichhorn, 1986). Finalmente, luego de ocurrida la fecundación se pueden observar pequeños frondes (Campbell & Reece, 2007; Gabriel y Galán, Prada, & Rolleri, 2008; Raven, Evert, & Eichhorn, 1986). Se ha determinado también que los helechos están ya listos para su trasplante al tener mínimo tres frondes distinguibles o bien 5 cm de altura, en esta fase se pueden trasplantar a macetas o semilleros hasta su desarrollo de unos 15 cm, que se consideran ya completamente adaptados y establecidos.

### 3.9.2 El cultivo *In vitro*:

El cultivo de tejidos vegetales o micropropagación es un conjunto de técnicas diversas para la siembra de cultivos vegetales en laboratorio. Presentan en común el trabajo con un explante, una parte de una planta madre, que se cultiva en condiciones de laboratorio en un medio de cultivo artificial rico en los nutrientes que

necesitan las plantas para desarrollarse. Esta metodología surgió hace más de 130 años atrás (Cruz, 2012; Sharry, Adema, & Abedini, 2015).

La micropropagación se basa en la totipotencialidad de las células vegetales y la producción clonal de una planta madre (Cañal, Rodríguez, Fernández, Sánchez-Tames, & Majada, 2001; Fernández, Casares, & Ordás, 2013; Sharry et al., 2015). Los cultivos clonales se basan en el interés de una planta madre con las características específicas deseadas por el cultivador (Cassells, 1997). Sin embargo, también puede darse por medio de semillas (Arditti, 2008; McKendrick, 2000; Murillo-Gómez, Naranjo, Callejas, Atehortúa, & Urrea, 2014; Silva, Winarto, Dobránszki, & Zeng, 2015), esporas (López-Romero et al., 2016; Narváez-Parra, Jérez-Jaimes, & Mantilla-Serrano, 2013; Reyes et al., 2019; Seguí, 2010) o por medio de la generación de callo desde un tejido no meristemar (Fernández et al., 2013; Jahan et al., 2009; Ranyaphi, Mao, & Borthakur, 2012; I. Vasil, 1991). En todos los casos el crecimiento y desarrollo de las plantas deseadas ocurre, entonces, en recipientes de diferentes naturalezas, y bajo condiciones controladas en laboratorios con instalaciones apropiadas para dichos cultivos (Cañal et al., 2001; Fernández et al., 2013).

Hay una serie de procedimientos a seguir en el cultivo de tejidos vegetales. El proceso puede resumirse en 5 etapas: a) obtención del material de la planta madre; b) protocolos de asepsia o desinfección; c) establecimiento del cultivo *in vitro* o siembra inicial; d) proliferación; e) enraizamiento. Se puede mencionar una fase adicional de aclimatación, que es ya por fuera de las condiciones de laboratorio propiamente dichas, conocida como fase *ex vitro* de endurecimiento (Fernández et al., 2013; Sharry et al., 2015).

Dentro de los protocolos de asepsia se incluye la esterilización y/o desinfección de todo material que se vaya a usar durante el proceso de la siembra. Debe incluirse el material vegetal y los instrumentos de laboratorio (Fernández et al., 2013). Además, un laboratorio de cultivo de tejidos cuenta con áreas destinadas para diferentes procedimientos, esto contribuye a su vez con la asepsia de los cultivos.

Al menos tres deben estar presentes: uno para la preparación de medios, uno para la limpieza y eliminación de medios o cultivos contaminados, y el área de siembra del cultivo y su mantenimiento (Cruz, 2012; Sharry et al., 2015). La necesidad de instalaciones y condiciones especiales refleja un aumento en los costos de producción de los cultivos, mismos que pueden ser justificados por la cantidad de plantas que pueden producirse en la etapa final (Barros et al., 2008; Sharry et al., 2015).

El cultivo *in vitro* cuenta con las siguientes ventajas: se pueden producir organismos de forma vegetativa por medio de la manipulación del medio de cultivo con el conjunto de características deseadas; el saneamiento de plantas infectadas; la producción masiva de un cultivo sin que se vea afectado por factores climáticos; generación de plantas libres de plagas y enfermedades (Cruz, 2012; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993; Sharry et al., 2015). Para el cultivo de helechos lo anterior también aplica (García, Torres, & Romero, 2013; Janssens & Sepelie, 1989; Winarto & Teixeira da Silva, 2012).

Los explantes se siembran en un medio de cultivo (Fernández et al., 2013; Jain & Häggman, 2007). Un medio se define como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos que suplen los requerimientos nutricionales de los organismos. Puede incluir agentes exógenos, en su mayoría hormonas, que sirven para la manipulación de los cultivos en las diferentes fases, todo dispuesto junto a un material de soporte y gelificación, generalmente agar o algún otro compuesto sintético (Aasim, Karataş, Khawar, & Doğan, 2013; Fernández et al., 2013; Martin, Cárdenas, & Pacheco, 2012; McKendrick, 2000; Pawlowski, Grelon, & ArM&Strong, 2013). Para la realización de los medios de cultivos se hacen primero soluciones madre que contienen los nutrientes ya disueltos y que por medio de relaciones sencillas son fácilmente manejables según el tipo de medio y la cantidad a trabajar (Fernández et al., 2013; Sharry et al., 2015). Con las soluciones madre ya preparadas, se pasa a hacer la mezcla junto con el solidificante para la elaboración del medio (Cruz, 2012; Martin et al., 2012; Sharry et al., 2015).

El estudio realizado en 1962 por los Doctores Murashige y Skoog con plantas de tabaco dio como resultado un medio de cultivo base de minerales y vitaminas que se ha adecuado a la mayoría de las especies (Cruz, 2012; Sharry et al., 2015). Las concentraciones de sales y vitaminas que contiene son las adecuadas para un normal crecimiento de muchas especies de plantas en condiciones *in vitro* aún sin la manipulación hormonal. Este medio es el medio de cultivo estándar y la base de muchos otros estudios de propagación; se conoce comúnmente como medio M&S.

Las soluciones madre para el medio M&S son: de macronutrientes, de micronutrientes, de vitaminas (Kyte & Kleyn, 1987; I. K. Vasil, 1990). Se pueden tener diferentes modificaciones en cuanto a las proporciones o bien si se añadirán soluciones de hormonas, o cualquier otro componente (como carbón activado) que ayude al desarrollo de diferentes fases del crecimiento vegetativo (E. Archila, 2014; Cruz, 2012; Fernández et al., 2013; Kyte & Kleyn, 1987; Sharry et al., 2015; Thomas, 2008). El medio también requiere una fuente de carbohidratos, debido a la poca actividad fotosintética que puede llegar a producirse por el tejido *in vitro* (Fernández et al., 2013). Muchos utilizan directamente glucosa o una modificación de la misma (Jain & Häggman, 2007; Kyte & Kleyn, 1987; Rice, Alderson, Hall, & Ranchhod, 1992) sin embargo puede sustituirse por otra fuente más económica como sacarosa en forma de azúcar de mesa común debido a la reducción de costos y buenos resultados (Fernández et al., 2013).

El medio de cultivo requiere además: aminoácidos y vitaminas que contribuyen en el metabolismo de los organismos y son fuente esencial de nitrógeno orgánico; agua (en forma de agua desmineralizada); y tener el pH correcto. El pH del medio de cultivo influye en la correcta gelificación del mismo, así como en la capacidad de los organismos vegetales de absorber los nutrientes, ya que los mismos estarán disponibles o no según el pH del medio en el que crece la planta, por ejemplo para orquídeas se suele usar el pH 5.5 mientras que para cultivo M&S tradicional se usa un pH de 5.8 a 5.9 (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Escaso et al., 2010; McKendrick,

2000; Morales, 2011). El pH se revisa por medio de un potenciómetro, y se lleva al punto deseado por medio de correctores de pH. Las enmiendas son usualmente una solución de Hidróxido de Sodio para elevar el pH, o bien una solución de Ácido Cítrico, Ácido Clorhídrico o Ácido sulfúrico para bajar el pH (Fernández et al., 2013). Una vez preparadas las soluciones madre y elaborado el medio de cultivo se procede a la siembra (Cruz, 2012; Sharry et al., 2015).

La fase crítica de la siembra *in vitro* es el establecimiento debido a posibles problemas de contaminación (Cañal et al., 2001; Cruz, 2012; Sharry et al., 2015). La contaminación del medio con hongos o bacterias suele ser un problema. Estos organismos se desarrollan con facilidad en los medios de siembra y una vez contaminado el material, es muy difícil recuperar a los organismos. La contaminación representa pérdidas, y un aumento de los costos de producción y es una clara desventaja (Cassells, 1997). El origen de estos organismos patógenos puede ser el mismo explante, que no fue desinfectado de manera apropiada, o bien por mala práctica de laboratorio, por mal manejo en el área de desinfección, mal manejo o errores en la esterilización de las herramientas de siembra y propagación, o agentes externos que ingresan por prácticas inadecuadas de asepsia personal o con el equipo (Cruz, 2012; Sharry et al., 2015; Winarto & Teixeira da Silva, 2012).

Cuando el cultivo se ha establecido *in vitro*, y no hay evidencia de contaminación, se crean subcultivos según las necesidades del cultivador (Fernández et al., 2013). Es necesaria la rotación del medio una vez cada tres semanas a cinco semanas (dependiendo la naturaleza del cultivo), ya que las plantas consumen los nutrientes, se degradan las hormonas o bien necesitan mayor espacio para poder desarrollarse (Fernández et al., 2013; Jain & Häggman, 2007; Murillo-Gómez et al., 2014; Rice et al., 1992). Así los cultivos pueden tener sucesivas fases de propagación y selección de individuos, según los estándares deseados. Aquellos organismos que no cumplan con los requerimientos suelen desecharse (Fernández et al., 2013; Jain & Häggman, 2007; Rice et al., 1992). Finalmente, después de los subcultivos deseados y que las plantas hallan alcanzado las últimas fases de desarrollo, se

procede a la salida del laboratorio para la fase de aclimatación y endurecimiento (Cañal et al., 2001; Cruz, 2012; Sharry et al., 2015).

### 3.9.3 El cultivo *in vitro* de helechos

El cultivo *in vitro* de helechos cumple con lo anteriormente expuesto. Cuenta con las fases de siembra inicial, establecimiento y subcultivos. El cultivo puede darse por medio de la siembra directa de esporas o bien desde tejido vegetativo de esporofitos (Taha, Haron, & Wafa, 2011; Winarto & Teixeira da Silva, 2012). Es más común la reproducción por esporas debido a los porcentajes de éxito y la garantizada formación de muchos individuos con la ventaja de la variabilidad genética que ofrecen las esporas (Bernabe et al., 1999; Gabriel y Galán et al., 2008; González-Rosas, Herrera-Meléndez, & Ramos-Villaseñor, 2006; Jiménez, 2012<sup>a</sup>; Ospina et al., 2015; Pence, 2015; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993; Ramos, Giudice, Pipo, & Luján, 2014).

En helechos se han intentado diferentes medios de cultivo. Entre ellos podemos mencionar modificaciones con diferentes proporciones de carbohidratos, hormonas y antioxidantes del medio M&S convencional (González-Rosas et al., 2006; Juárez-Orozco, Orozco-Segovia, Mendoza-Ruiz, & Pérez-García, 2013; Pence, 2015; Rodas, 2010; Ruiz, 1995; Winarto & Teixeira da Silva, 2012; Wu, Liu, Ji, & Chen, 2010). Se han utilizado además: el Medio de Thomson (Bernabe et al., 1999; Farfán-Santillán, Mendoza-Ruiz, Pérez-García, & Velázquez-Montes, 2017; Mendoza-Ruiz & Pérez-García, 2009); el Medio de Dyer (Randi & Hiendlmeyer, 2007; Seral, Flores-Bavestrello, & Gabriel y Galán, 2016); cultivo en Agar nutritivo sin modificar (López-Romero et al., 2016); el Medio de Knop's con los micronutrientes de Heller (Rashid, 1972); Agar-Agar sin nutrientes (Ko, 2003); el Medio de Meyer (de Vargas & Droste, 2014; Juárez-Orozco et al., 2013; Rechenmacher, Schmitt, & Droste, 2010); el Medio de Parker y Thomson (Shukla & Khare, 2012); y Medio de Knudson (Janssens & Sepelie, 1989). Cada investigación presentó diferentes fallas, porcentajes de germinación y de éxito. Se eligió para esta investigación el medio

M&S convencional sin modificar como un acercamiento a los requerimientos de los helechos elegidos.

Ramos, Giudice, Pipo, & Luján, (2014) estudiaron dos especies del género *Thelypteris* de la reserva natural de Buenos Aires, Punta Lara, Argentina. Estas fueron cultivadas *in vitro* en el medio de cultivo Dyer. En este caso la fenología de los gametofitos y desarrollo de los esporofitos como un esfuerzo inicial de la conservación de estas especies, ya que una vez obtenido el esporofito las subsecuentes fases pueden desarrollarse a partir de protocolos establecidos. En cuanto al estudio de Pence, (2015) con un *Asplenium* utilizó de primero el cultivo *in vitro* con el medio Murashige y Skoog (Medio M&S), así como un método de esterilización de las esporas menos agresivo, seguido de una fase de adaptación y establecimiento en sustrato, en un sistema controlado. En este caso los gametofitos fueron observados 24 meses después de la siembra. Sin embargo, el desarrollo de los esporofitos fue pobre, y el cultivo vegetativo *in vitro* tampoco tuvo éxito.

Wu et al., (2010) trabajaron con una especie de *Adiantum* basados en las condiciones básicas para la germinación de un helecho: luz, disponibilidad de nutrientes, humedad y carbohidratos. Querían determinar las condiciones óptimas de propagación de este helecho. Utilizaron diferentes modificaciones del medio M&S. Llegaron a la conclusión que el medio ideal es el de  $\frac{1}{4}$  M&S con 15g/L de azúcar, sin embargo, el mejor medio para el posterior desarrollo es el de  $\frac{1}{2}$  M&S con 30g/L de azúcar. También mencionan que pueden oxidarse o perderse gametofitos durante el cambio de un medio de germinación a uno de desarrollo, generando pérdidas considerables de individuos.

Winarto & Teixeira da Silva, (2012) buscaban generar un protocolo para la reproducción *in vitro* de *Leather leaf*, que pudiera competir con el cultivo tradicional por medio de rizomas. Por medio de un medio M&S con diferentes proporciones de hormonas lograron la diferenciación de explantes de rizomas, sin embargo, de cada fragmento de rizoma solo pueden obtenerse un máximo de 5 subcultivos, siendo insuficientes a comparación de los 22 que pueden obtenerse tradicionalmente.

Farfán-Santillán et al., (2017) trabajó con algunas Gleicheniaceae de México, obtuvo con el medio de Thomson, la germinación promedio de 20 días, observó gametofitos a entre los 30 y 74 días. La diferenciación de todas las especies evaluadas fue de más de 100 días, alcanzando 310 días en *Sticherus bifidus*.

Así, muchos gametofitos pueden tardar meses en emerger, y al ser inconspicuos pasan desapercibidos en la naturaleza. En condiciones *in situ* si los gametofitos están muy lejanos entre sí y no ocurre la fecundación, la generación del esporofito es prácticamente imposible (Mehltreter et al., 2010). Ahora bien, en condiciones *ex situ*, aunque se tenga control sobre los gametofitos en cuanto a su distribución espacial, la fenología propia de las especies genera problemas en cuanto a los tiempos de cultivo, desarrollo, adaptación y establecimiento; algunos autores han recomendado ampliar el estudio del cultivo *in vitro* en helechos y sus posibles aplicaciones (Mehltreter et al., 2010; Page, 2002; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993).

#### 3.9.4 Programas de conservación de helechos

Los esfuerzos de conservación suelen ser específicos y enfocados a especies que son “notorias”, con importancia comercial (nacional o internacional) y muchas veces sin tomar en cuenta el estado del conocimiento de las especies (Isasi, 2011; Noss, 1990). Entre los taxones menos estudiados en el país están los helechos, puesto que no se consideran de importancia comercial de impacto, tampoco tienen un impacto importante en el paisaje, y a diferencia de como ocurre con los animales, las plantas no son consideradas como especies paraguas o bandera, por lo que han sido relegados a un segundo plano en los esfuerzos de investigación y conservación en Guatemala (Isasi, 2011; Jiménez, 2012<sup>a</sup>; Noss, 1990).

Véliz & Vargas, (2006) hacen mención que la conservación de los helechos depende, primero, de un análisis de la distribución y la abundancia de las poblaciones, sobre todo para los trabajos de conservación *in situ*. En cuanto al

manejo *ex situ*, depende del conocimiento de la biología, fenología y ecología de las especies para poder propagarlas (Mehltreter et al., 2010; Véliz & Vargas, 2006).

Mehltreter et al., (2010) indica que la importancia de los estudios a mediano y largo plazo es el desarrollo de información sobre la fenología de los helechos, así como la ecología y condiciones de adaptabilidad, y recalca que los estudios deberían de abarcar el ciclo de vida completo de los organismos, desde la germinación hasta la madurez, aunque esto último también es un problema, puesto que en la mayoría de las ocasiones transcurren varios años hasta alcanzar la madurez los organismos. La conservación *ex situ* de los helechos ha sido practicada utilizando varias técnicas: reproducción por esporas, reproducción vegetativa y reproducción *in vitro* (Jiménez, 2012<sup>a</sup>). La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala han practicado la propagación y el cultivo de varios especímenes, entre ellos un helecho arborescente (datos no publicados) (Jiménez, 2012<sup>a</sup>).

Ospina, Briones, & Pérez-García, (2015) trabajaron en la germinación de *Alsophila firma*, *Cyathea divergens* y *Lophosoria quadripinnata* en diferentes condiciones de luz, potencial de agua y apertura del dosel, entre las observaciones más importantes están el éxito de la germinación al ser expuestas a la luz del espectro del rojo, así como la inundación del sustrato para una correcta fecundación, y el control de la temperatura. Bernabe, Williams-Linera, & Palacios-Rios, (1999) trabajaron con tres helechos arborescentes: *Alsophila firma*, *Lophosoria quadripinnata* y *Sphaeropteris horrida*, que fueron colectados en el jardín botánico Javier Clavijero en Xalapa, Veracruz, México. Fueron cultivados *in vitro*, en el medio de Thomson y en sustrato estéril como medio comparativo. Entre sus resultados más importantes están datos fenológicos de las tres especies y que *Alsophila firma*, *Lophosoria quadripinnata* crecieron mejor en condiciones limítrofes del bosque, mientras que *Sphaeropteris horrida* se desarrolló mucho mejor en bosque interior. Gabriel y Galán, Prada, & Rolleri, (2008) estudiaron el desarrollo morfológico y la expresión sexual de los gametofitos de *Polypodium feuillei*. Estos fueron cultivados *in vitro*. Los datos

fenológicos y la proporción de los sexos en los gametofitos fueron los principales aportes de este estudio.

Otro esfuerzo por conservación de helechos arborescentes fue el de Eleutério & Pérez-Salicrup, (2009). En este caso se observaron que muchos esporofitos jóvenes crecían a las orillas del camino, y que estos eran retirados por mantenimiento de las carreteras. Así decidieron trasplantar los helechos jóvenes a áreas para su desarrollo, esto conlleva el ahorro de programas de reproducción desde las esporas, e incluso el desarrollo de estos helechos para horticultura. Se trabajaron tres *Cyathea* y un *Alsophila*. El éxito de los trasplantes abrió un nuevo campo de investigación y desarrollo por medio del trasplante de plantas jóvenes. Ellos observaron que el género *Cyathea* se adapta mejor en condiciones de sombra, e incluso acelera su crecimiento, mientras que el trasplante de *Alsophila* tuvo un claro efecto en los organismos, viéndose con un crecimiento lento y con pocos frondes. Todas las investigaciones mencionadas son esfuerzos por el estudio de la propagación, fenología y establecimiento de diferentes helechos, ya sea con fines de conservación o no.

Uno de los mayores inconvenientes con posibles programas de conservación y establecimiento es el lento crecimiento de estos organismos, con pocas excepciones conocidas de helechos epífitos o bien pioneros. Esto se cree que es porque son organismos de larga vida, perennes en los trópicos, lo cual conlleva un lento desarrollo hasta alcanzar la madurez (Page, 2002). Muchos gametofitos pueden tardar meses en emerger, y al ser inconspicuos pasan desapercibidos; además, en condiciones *in situ* si los gametofitos están muy lejanos entre sí y no ocurre la fecundación, la generación del esporofito es prácticamente imposible (Mehltreter et al., 2010). Una limitación en la fase de adaptación y establecimiento es la intolerancia de los esporofitos a cambios bruscos en el ambiente. Cambios en la cobertura del dosel, fluctuaciones anormales en la humedad e incluso cambios en las corrientes del viento, que pueden provocar que la expansión de los frondes se detenga, o bien que los frondes ya establecidos lleguen a perderse. Aunque

estas limitaciones pueden usarse como buenos indicadores ecológicos, generan problemas para programas de conservación y recuperación de las poblaciones (Page, 2002).

### **3.10 Estudios realizados en Guatemala sobre helechos**

Los helechos son un grupo poco estudiado en el país. Entre los trabajos que se han realizado podemos mencionar los trabajos de Jorge Jiménez, quien ha trabajado con los helechos en diferentes ámbitos: identificación y evaluación de helechos en peligro de extinción a nivel nacional y algunas propuestas para la conservación (Jiménez, 2012<sup>a</sup>). También presenta el estado del conocimiento de los helechos en Guatemala en el libro Biodiversidad de Guatemala II del ed. Enio Cano (Jiménez, 2012b). Se puede mencionar además su trabajo, enfocado en la diversidad de helechos de las áreas protegidas del Corredor del Bosque Nuboso en Purulhá, Baja Verapaz (Jiménez, 2009b) del cual surge el libro publicado por el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica -InBio- de los Helechos del Corredor del Bosque Nuboso de Baja Verapaz, Guatemala (Jiménez, 2009<sup>a</sup>). Jiménez, (2012b), hace una revisión del estado del conocimiento del grupo, rastreando el origen con las publicaciones de Stolze, Benjamin, & Hickey, (1983) y Stolze, Mickel, & Smith, (1981), quienes, en los tres tomos de La Flora de Helechos de Guatemala, reportan 599 helechos y 53 licofitas. Uno de los principales problemas con la investigación del taxa, según Jiménez, (2012b) es que la mayor parte del territorio nacional está prácticamente inexplorado, y hay pocos expertos de helechos en el país.

En cuanto al cultivo *in vitro* para Helechos de Guatemala, existen algunas investigaciones. Podemos mencionar la Tesis de grado de Ruiz (1995), quien trabajó con *Cibotium regale*, *Dicksonia gigantea*, *Alsophila salvinii*, *Cyathea divergens var. tuerckheimii* y *Lophosoria quadripinnata*. Aplicó varios protocolos de desinfección de esporas que incluían diferentes concentraciones de Hipoclorito de Sodio v/v y medio M&S, tanto en sólido como en líquido, con una temperatura de 20° y un fotoperiodo de 16 horas. De lo anterior sólo tuvo éxito con la especie C.

*regale* la cual germinó en 16 días, pero el desarrollo del gametofito y formación posterior de esporofitos tardó 11 meses. Llegó a la conclusión que el protocolo de desinfección debía mejorarse y que la concentración de cloro mayor al 10% era fatal para las esporas.

En cuanto a la tesis de Portillo, (2002), se concentró en evaluar cinco medios de cultivo para el helecho *Cnemidaria mutica* C. Presl. Los medios con los que trabajó fueron:  $\frac{1}{2}$  M&S, correspondiente a la mitad de las concentraciones del Medio M&S convencional; medio de Knudson C;  $\frac{1}{2}$  Moore, correspondiente a la mitad de las concentraciones del Medio de Moore convencional; Miller y Miller; y el medio de White. Los medios mencionados anteriormente varían entre sí en cuanto a los macro y micronutrientes que los forman, así como las concentraciones de los mismos. Estandarizó el pH a 5.5. Para el proceso de desinfección utilizó únicamente hipoclorito de sodio al 0.5%, ya que llegó a la conclusión que una concentración mayor inhibía la germinación. Hizo un total de 10 repeticiones de cada medio en tubos de ensayo. En su caso el promedio de germinación de las esporas fue de 21 días, y el medio con mayor porcentaje de éxito fue el  $\frac{1}{2}$  M&S seguido del de Miller y Miller con 8 tubos de ensayo exitosos de los 10 sembrados. También concluyó que el desarrollo de los gametofitos era mejor cuando los mismos no estaban tan unidos, estandarizando una cantidad de gametofitos por tubo de 10, los mismos crecían mejor y se obtenían los esporofitos más rápido. Además, en una fase posterior maceró los gametofitos para generar nuevos individuos y aumentar el porcentaje de generación de esporofitos, sin embargo concluyó que la maceración de los gametofitos no contribuía a la apogamia -formación de esporofitos a partir de células no sexuales-. Cabe mencionar que lo anterior se debe a que los gametofitos son haploides por lo que un individuo diploide no puede surgir sin la fecundación previa (Schneider, 2012). El experimento de Portillo (2002) fue exitoso en 75 días.

La Tesis de Grado de Archila, (2015) se basó en la restauración de la Reserva Privada de Orquígonia. Para dicho proyecto se caracterizó primero la zona y se eligieron 3 localidades dentro de la finca, donde se crearon parcelas. De cada

parcela se realizó una evaluación de flora, fauna y suelo. La segunda fase era el rescate y siembra de las especies elegidas y la tercera fase fue el monitoreo a lo largo de 7 años ( 2007 -2014). Además del atractivo del área que son las orquídeas de la Familia Archila, tanto nativas como introducidas, la localidad cuenta con flora propia de un bosque nuboso. Entre la flora predominante estaban los helechos arborescentes *Cyathea valdecrenata*, *C. bicrenanta*, *C. divergens var. tuerckheimii*, *C. microdontha* y *Sphaeropteris horrida*. De las especies anteriores las especies *S. horrida*, *C. divergens var. tuerckheimii* y *C. valdecrenata* fueron clave en la restauración del área. Los helechos cambiaron la dinámica de las copas de los árboles, beneficiando a las orquídeas que prefieren condiciones de sombra o media luz, así mismo la humedad prevaleciente en el ambiente aumentó, disminuyendo la necesidad y frecuencia de riego de las plantas por parte del personal de la finca, y mejorando las condiciones del resto de plantas epífitas, que incluyen musgos, helechos no arborescentes y bromelias, que a su vez contribuyen en el mantenimiento del bosque nuboso del área.

#### 4 Justificación

En los países neotropicales se ha aprovechado poco la diversidad de helechos tal es el caso de México y el Caribe (González-Rosas et al., 2006). Así mismo es bien sabido que la propagación asexual es lenta y costosa, por ello se han propuesto diferentes metodologías simples para la reproducción por esporas como el caso de la investigación de Barros, Salinero, Vela, & Sainz, (2008), o diferentes protocolos para la reproducción *in vitro* ((Bernabe et al., 1999; Del, Polytrichum, Morantes, Prieto, & Linares, n.d.; Gabriel y Galán et al., 2008; González-Rosas et al., 2006; Jiménez, 2012<sup>a</sup>; Ospina et al., 2015; Pence, 2015; Portillo, 2002; Ramos et al., 2014; Ruiz, 1995; Sharry et al., 2015; Wu, Chen, Yuan, & Chen, 2009). Tanto las metodologías convencionales como la reproducción *in vitro* han sido implementadas para la reproducción de helechos nativos de los países de los investigadores, así como para helechos exóticos, ornamentales y también con fines de conservación, o bien con fines comerciales (Barros et al., 2008; González-Rosas et al., 2006; Pence, 2015; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993).

Guatemala cuenta con unas 782 especies de helechos (Véliz, 2008). Sin embargo, la investigación en este taxa de plantas es prácticamente nula (Jiménez, 2012b). Los géneros más diversos son *Asplenium* con 65 especies, *Thelypteris* con 64, *Polypodium* con 41, *Adiantum* con 30 y *Trichomanes* con 25. Dentro de este grupo, también se encuentran los helechos arborescentes, pertenecientes a los géneros *Marattia*, *Cyathea*, *Dicksonia*, *Alsophila*, *Cibotium*, *Cnemidaria*, *Culcita*, *Lophosoria* y *Sphaeropteris*. Estas especies, típicas de bosques nubosos y selvas húmedas, están incluidas dentro del Apéndice II de CITES y posiblemente sean las especies de helechos con mayores amenazas por la presión humana, ya que de ellas se obtienen fibras para diferentes fines, como lo son la preparación de artesanías, o vigas para construcción (Muñiz Díaz De León et al., 2005; Véliz, 2008; Véliz & Vargas, 2006). En la Lista de Especies Amenazadas de Guatemala -LEA- se incluyen 64 helechos en peligro (CONAP, 2009).

Los helechos arborescentes han sido sometidos a la presión de la extracción de los bosques en todo el trópico (Eleuterio, 2006; Ramirez-Valencia, Sanin, & Alvarez-Mejia, 2009). Muchas veces las poblaciones humanas extraen de las áreas naturales la materia prima para el desarrollo de las comunidades, esto incluye toda aquella materia prima que pueda usarse de los helechos, sobre todo de los helechos arborescentes (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). Su sistema radicular no cuenta con una raíz primaria axonomorfa, en cambio se conforma por una serie de pequeñas raíces secundarias adventicias (Ramirez-Valencia et al., 2009). Esta masa de pequeñas raíces constituye un sustrato ideal para plantas epífitas ya que es permeable, y permite la correcta ventilación, sin embargo, para obtener la masa de raíces es necesario el sacrificio del organismo adulto (Eleuterio, 2006; Véliz & Vargas, 2006). En Guatemala, la región de las Verapaces es donde los helechos son extraídos debido a los variados usos que las comunidades humanas les dan: alimentación, material de construcción, elaboración de artesanías, macetas, sustrato para cultivo, venta de diferentes bromelias y orquídeas que son colocadas en macetas tradicionales de “Chipe” y en menor medida como planta ornamental. Entre las especies que producen más raíces están las dos elegidas para esta investigación: *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* y *Sphaeropteris horrida* (Véliz & Vargas, 2006).

Diseñar, establecer y validar una metodología de propagación de helechos es vital para su reinserción en los ecosistemas. Un programa de reproducción que económicamente sostenible y viable, para aplicar en futuros programas de conservación, es el primer paso hacia la recuperación de las poblaciones nativas en los bosques nubosos de Guatemala ya que parte importante del ámbito de la Biología, es el velar por los estados de conservación de la diversidad biológica y poner en práctica métodos para la conservación de los organismos para crear metodologías accesibles a las comunidades y los programas que velan (Mehltreter, 2014; Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993).

## **5 Objetivos**

### **5.9 General**

Validar una metodología para la propagación y establecimiento de helechos arborescentes que sea económicamente viable para futuros proyectos de conservación.

### **5.10 Específicos**

- Diseñar una metodología nueva para la germinación de esporas y el posterior establecimiento de helechos que sea económicamente viable para posteriores proyectos de conservación.
- Comparar la nueva propuesta de propagación con metodologías convencionales para establecer el porcentaje de eficiencia.
- Inferir sobre los posibles usos de la nueva metodología en futuros proyectos de conservación.

## **6 Hipótesis**

El porcentaje de germinación y establecimiento de esporofitos jóvenes es igual o mayor con la nueva metodología propuesta en comparación con las metodologías convencionales, además de ser económicamente más eficiente.

## **7 Diseño Experimental**

### **7.9 Población**

Los helechos arborescentes *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* y *Sphaeropteris horrida* pertenecientes al corredor del bosque nuboso guatemalteco.

## 7.10 Muestra

La muestra está constituida por las esporas obtenidas de los frondes maduros de 3 individuos de *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* y *Sphaeropteris horrida* dentro del Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal y 3 individuos de ambas especies en la Reserva Privada ORQUIGONIA.

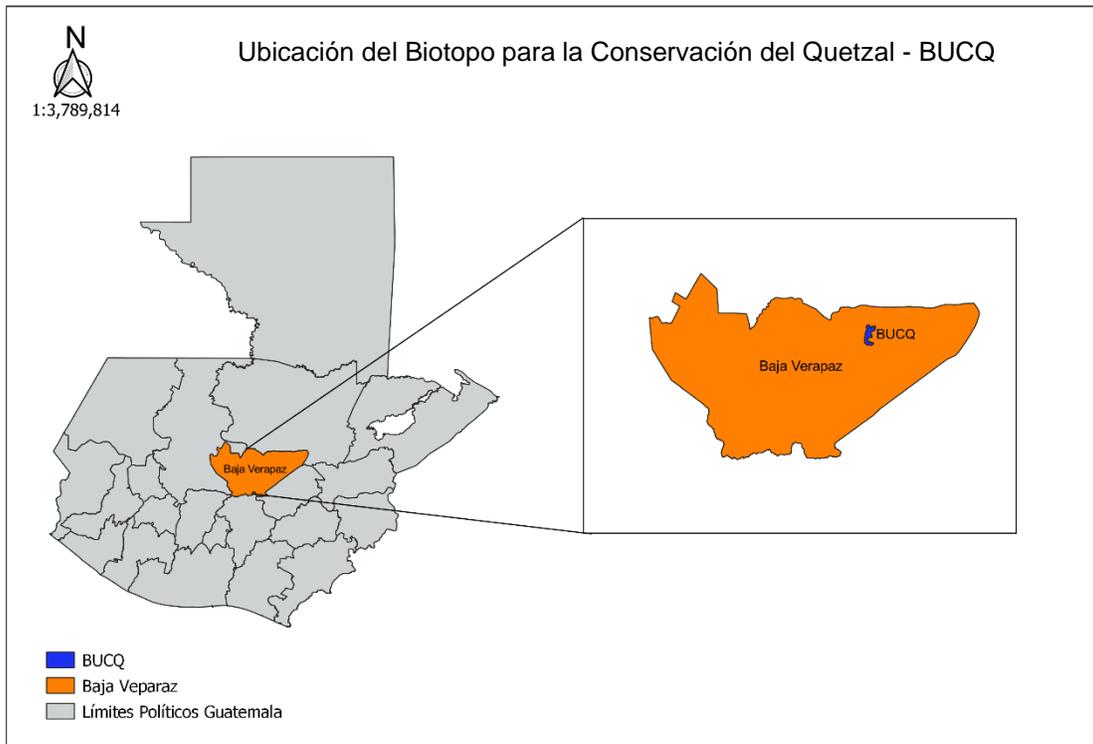
## 7.11 Área de estudio

### 7.11.1 Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal

El Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal (BUCQ) es un área protegida que representa al bosque nuboso guatemalteco (Ávila et al., 2006; CECON, 1999). Está ubicado al noreste de la Sierra de Chuacús, entre los municipios de Salamá y Purulhá, departamento de Baja Verapaz y su rango altitudinal es de los 1,600 a los 2,300 msnm (CECON, 1999; Méndez et al., 2011). Como lo especifica el Plan Maestro, El Biotopo Universitario para la Conservación del Quetzal (BUCQ) Mario Dary Rivera, fue creado el 2 de junio de 1976 y tiene un total de 1,044 Hectáreas. Pertenece a la categoría II de manejo de Áreas protegidas (Artículo 89, inciso “a”, Ley de Áreas Protegidas). Sus coordenadas son 90°13’15” de latitud y 15°30’0” de longitud. La temperatura media anual es de 19.49 °C, mientras que la humedad relativa promedio oscila entre el 85.5% y 95.9%, el promedio anual es de 90.7%. La lluvia promedio anual registrada es mayor a los 2000 mm y los meses más lluviosos abarcan de junio a septiembre. La mayor parte del área del Biotopo se encuentra representada por bosque nuboso denso y semidenso, dentro de la cual se observan pequeñas porciones de vegetación disturbada, por invasiones pasadas y recientes que fueron desalojadas por la vía legal (Ávila et al., 2006; CECON, 1999; CONAP, 2011; Méndez et al., 2011). En la figura 6 se muestra la ubicación del BUCQ.

Según Véliz y Vargas (2006), al Arco Húmedo del Norte, y las especies de helechos arborescentes presentes son: *Lophosoria quadripinnata* var. *quadripinnata*, *Culcita*

coniifolia, Cibotium regale, Dicksonia sellowiana, Alsophila salvinii, Alsophila tryoniana, Cyathea bicrenata, C. valdecrenata, C. fulva, C. divergens var. tuerckheimii, Sphaeropteris horrida, Marattia excavata, M. interpósita y M. weinmanniifolia.



**Figura 6. Mapa del sitio de muestreo correspondiente al Biotopo del Quetzal.** En el mapa se observa que el Biotopo para la Conservación del Quetzal se haya en el norte del departamento de Baja Verapaz.

#### 7.11.2 Reserva Natural Privada, Centro de Conservación ORQUIGONIA

ORQUIGONIA se localiza en las coordenadas geográficas 15°26'16.9" latitud norte y 90°24'44.2" longitud oeste en el municipio de Cobán, cabecera departamental de Alta Verapaz, en jurisdicción de la aldea Chicuxab, sobre la Ruta Las Verapaces, km 206 (vuelta del Triunfo) a 150 metros de la carretera (CA-14) asfaltada Ver la figura 7. La finca tiene un área total de 13,000 m<sup>2</sup>. Se reporta una precipitación anual



ya que en la línea base se registró un total de 358 plantas, con el inventario de la restauración a la fecha se registró un total de 12,331 plantas (abundancia absoluta), que fueron agrupadas en 43 familias totales (Archila, 2015).

## **7.12 Materiales**

A continuación, se presentan los materiales utilizados en la presente investigación. En el anexo 1 se encuentra el manual de elaboración de las soluciones madre. En el anexo 2 se encuentra el manual de la elaboración de 1L de medio M&S. En el anexo 3 se halla una lista detalla de los precios por unidad de cada uno de los ítems, información de utilidad para la relación costo/beneficio de cada método.

### 7.12.1 Materiales para la gira de campo

- Guacamaya de mano
- Linterna
- Sobres de papel manila
- Marcador permanente Sharpie
- Equipo fotográfico Nikon®
- Masking Tape ¾" (rollo)
- Tijeras convencionales
- Juego de pinceles de fibra sintética
- GPS
- Teléfono Celular

### 7.12.2 Materiales para el método de propagación convencional.

- Cajas de acrílico tipo camiseras, Guateplast © de 12L de capacidad
- Peat-moss preparado
- Jeringas comerciales de 5ml
- Aspersor manual
- Alcohol al 70% (1L)
- Guacal pequeño (unidad)
- Palas metálicas para jardín
- Marcador permanente Sharpie
- Notas Autoadhesivas (bloque)
- Limpiador de tela sintética
- Frasco de vidrio de 100ml

### 7.12.3 Materiales para el método nuevo de propagación propuesto

- Cajas de acrílico tipo camiseras, Guateplast ©
- Tela ojo de perdiz (yarda)
- Tela a base de algodón
- Jeringas comerciales de 5ml
- Alcohol al 70% (1L)
- Aspersor manual
- Marcador permanente Sharpie
- Limpiador de tela sintética

#### 7.12.4 Materiales para el mantenimiento de los métodos de propagación convencional y la nueva metodología propuesta

- Bolsa de Estreptol 500g (antifúngico y bactericida de amplio espectro)
- Botella de Bayfolan® Bayer© (Fertilizante Foliar completo)
- Agua desmineralizada
- Extracto de Neem (repelente de insectos natural)
- Higrómetros a distancia (toma de datos de humedad, temperatura, etc., equipo de 5 unidades a distancia y un almacenador de datos)
- Bombas de riego a presión manuales

#### 7.12.5 Compuestos químicos necesarios para elaboración del Medio de cultivo M&S sin hormonas:

- |                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| • Nitrato de amonio                  | $\text{NH}_4\text{NO}_3$                            |
| • Nitrato de potasio                 | $\text{KNO}_3$                                      |
| • Cloruro de calcio dihidratado      | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$           |
| • Sulfato de magnesio heptahidratado | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           |
| • Dihidrógeno fosfato de potasio     | $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            |
| • Ácido bórico                       | $\text{H}_3\text{BO}_3$                             |
| • Sulfato de manganeso monohidratado | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$            |
| • Sulfato de zinc heptahidratado     | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           |
| • Yoduro de potasio                  | $\text{KI}$   |
| • Molibdato de sodio dihidratado     | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ |
| • Sulfato de cobre pentahidratado    | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           |
| • Cloruro de cobalto hexahidratado   | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           |

- Cristales de sal disodio- dihidratado  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
- Sulfato de hierro heptahidratado  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Glicina  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$
- Tiamina monohidratada -HCl-  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Ácido nicotínico  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$
- Hidrocloruro de Piridoxina (Vitamina B<sub>6</sub>) Piridoxina -HCl
- Myo-inositol  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- Agar-Agar  $(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9)_n$
- Agua desmineralizada  $\text{H}_2\text{O}$
- Azúcar  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

#### 7.12.6 Insumos y equipo para la siembra *in vitro*

- Espátula de acero inoxidable con ápice curvo
- Tijeras quirúrgicas de acero inoxidable
- Pinzas medianas de acero inoxidable
- Pinzas pequeñas de acero inoxidable
- Tubo de ensayo de 75ml (p/alcohol p/flamear)
- Frasco de vidrio 100ml
- Pizeta de plástico 500ml (p/alcohol al 95%)
- Bandeja de acero inoxidable porta instrumentos
- Mango para bisturí #3
- Mango para bisturí #4

- Placa de vidrio de 20 cm x 20 cm
- Limpiador de tela sintética (paquete)
- Mechero
- Galón de plástico (para manejo de alcohol al 70% y al 95%)

#### 7.12.7 Cristalería para manejo de sustancias y soluciones

- Envases de 1L de capacidad (almacenamiento soluciones madre)
- Botella ámbar 500 ml (sol. Vitaminas)
- Frasco graduado 100ml (sol. Micronutrientes)
- Gotero 30ml (Tween 20® y hormonas)
- Piceta (500ml p/agua desmineralizada)
- Frascos de Vidrio 9onz (caja 24 unidades)

#### 7.12.8 Material descartable para protocolo de desinfección de esporas

- Cloro comercial
- Tween 20®
- Alcohol 70% (Galón)
- Filtros para cafetera

#### 7.12.9 Material descartable para la siembra en campana

- Mascarilla de 3 pliegues(caja)
  - Guantes (caja)
  - Bolsas para descartar (caja)
  - Hojas para bisturí # 10 (caja)
  - Hojas para bisturí #22 (caja)
  - Hojas de papel periódico (resma)
  - Papel Kraft (rollo)
  - Alcohol al 95% p/mechero y flamear (galón)
  - Marcador Sharpie
  - Etiquetas autoadheribles (paquete 100 unidades)
  - Cinta Testigo
  - Papel Mayordomo (Paquete)
  - Plástico termo-resistente para tapar los frascos de medio (rollo 15kg)
  - Hules (bolsa 1kg)
  - Masking Tape

- 7.12.10 Materiales para el mantenimiento del cultivo de tejidos *in vitro*
- Lámparas LED de luz blanca
  - Temporizador del fotoperiodo
  - Termómetro digital/data logger
  - Juego de estanterías
- 7.12.11 Materiales para limpieza y desinfección del cuarto de crecimiento
- Cloro comercial al 4%
  - Desinfectante comercial
  - Trapeador
  - Lysol ®
- 7.12.12 Material para la toma de datos de los tres métodos de propagación
- Tabla para escribir
  - Lapicero (caja de 12 unidades)
  - Boletas de toma de datos (hojas tamaño carta resma)
  - Gastos de movilización en vehículo propio por mes
- 7.12.13 Material para el procesamiento de datos
- Computadora Dell® Intel™ Core i7 7<sup>th</sup> gen, 16 RAM
  - Equipo fotográfico Nikon® - D5600 con los lentes 18-55mm y micro Nikkor 40mm.
  - Adobe® LightRoom® CC ver. 15.8
  - Adobe® Photoshop® CC ver 15.6
  - Microsoft Office 365 personal plus

### 7.13 Métodos

La metodología puede dividirse en las siguientes fases: a) la toma de muestras y colecta de las esporas; b) el diseño y la propuesta de la nueva metodología; c) protocolos de esterilización; d) comparación con formas de propagación ya establecidas; e) la validación de la nueva propuesta; f) la evaluación de la eficacia. A continuación, se presentará cada una de estas fases:

#### 7.13.1 Toma de muestras:

Se escogen esporofitos maduros con frondes fértiles, y los mismos son colocados en un contenedor que puede ser un sobre, una caja o una bolsa, y son agitados para extraer las esporas y que queden en el contenedor seleccionado (Farfán-Santillán et al., 2017; Gabriel y Galán et al., 2008; Juárez-Orozco et al., 2013; López-Romero et al., 2016; Mendoza-Ruiz & Pérez-García, 2009; Ospina et al., 2015; Randi & Hiendlmeyer, 2007; Rechenmacher et al., 2010; Rünk & Zobel, 2009; Wu et al., 2010). Bernabe y sus colaboradores, (1999) así como Page, (2002), recomiendan que debe hacerse lo posible por obtener esporas de padres diferentes, así se evitan problemas de autogamia, o bien que no haya coincidencia en la generación de los gametos masculinos y femeninos y así no ocurra la fecundación.

Si no se extraen suficientes esporas, pueden almacenarse los restos de los frondes fértiles en sobres de papel y dejarse al sol o usar una fuente de calor para promover la maduración y la liberación de las esporas (Barros et al., 2008; Farfán-Santillán et al., 2017; López-Romero et al., 2016). El tamizaje y limpieza de las esporas de cualquier resto de fronde, tierra u otros agentes es importante para disminuir el porcentaje de contaminación, así sea en un cultivo *in vitro* o en un cultivo convencional (Barros et al., 2008; Pence, 2015).

Se ha observado que las esporas de los helechos arborescentes son poco viables y su duración es solamente de algunas semanas o un par de meses a pesar de ser no clorofíticas (Pérez-García & Reyes-Jaramillo, 1993). Una recomendación para

mejorar la viabilidad de las esporas es almacenarlas en tubos o contenedores sellados, en un lugar seco y a temperaturas bajas (Dyer, 1979; Rünk & Zobel, 2009). Lo mejor en el caso de la siembra de esporas de helechos arborescentes es hacerlo lo antes posible una vez tomadas las muestras (Barros et al., 2008; Rünk & Zobel, 2009).

#### 7.13.2 Diseño y propuesta de una nueva metodología

El método propuesto es una modificación del método utilizado por el botánico alemán Uwe Martin Herbert Feldhoff Böhm para la propagación de bromelias y orquídeas que su empresa, Claveles del Aire, S. A., exporta. La técnica consiste en sustituir el sustrato común por uno sintético. Para la propagación de semillas de orquídeas y bromelias, se utiliza sarán de grado medio como sustrato, que se monta en marcos de madera para formar *recuadros de germinación*. Se esparcen las semillas en los marcos de manera horizontal, y la tela por medio de un sistema hidropónico se mantiene húmeda hasta la germinación de las semillas (U. Feldhoff, comunicación personal, 13 de noviembre de 2017). Lo anterior se basa en un principio básico para la germinación de semillas, el cual establece que para germinar las semillas se necesita únicamente humedad, y con ésta romper la latencia inicial, denominada fase I de la germinación. Durante la fase I se da la absorción de agua y el ensanchamiento de la semilla, ya que la entrada de agua produce una serie de alteraciones en la permeabilidad de las membranas de las semillas, esto a su vez desencadena una pérdida de solutos de bajo peso molecular y de algunos inhibidores de la germinación como el ácido abscísico o algunos compuestos fenólicos, así la semilla está lista para la siguiente fase de la germinación (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Campbell & Reece, 2007; Escaso et al., 2010).

Una vez la latencia se rompe, comienzan los procesos metabólicos, por medio de la hidratación de las enzimas que reactivan las rutas metabólicas. La reanudación de los procesos requiere de energía, en un principio se obtiene por fermentación a

falta de oxígeno, y gradualmente se reanuda toda la actividad celular (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Campbell & Reece, 2007; Escaso et al., 2010). En la tercera y última fase de la germinación se da la emergencia de la radícula. Una vez la raíz atraviesa los tejidos embrionarios y emerge, el metabolismo pasa a ser completamente aerobio. Así este punto crítico se toma como el límite entre la germinación de la semilla y el inicio del desarrollo de la plántula nueva (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Campbell & Reece, 2007; Escaso et al., 2010). Una vez las plántulas de las orquídeas y bromelias que se cultivan en Claveles del Aire, S.A. ya cuentan con raíces que se aferran a los marcos, se colocan de manera vertical, y se incluye una solución de nutrientes. Esta solución sustituye a los nutrientes obtenidos por el sustrato convencional y se le da seguimiento al desarrollo de las plántulas hasta que están listas para el trasplante a los pilones donde posteriormente serán vendidas.

Para los helechos lo anterior es viable, con unas modificaciones claves. No es posible usar sarán ya que las esporas no serían retenidas por el material. Se propuso sustituirla con una tela en base de algodón conocida como ojo de perdiz que se utiliza para pañales por su capacidad de absorción, resistencia y carecer de fibras sintéticas. La tela no sólo retendría las esporas, sino que además garantizaría guardar la humedad necesaria para la germinación de éstas. Esto se debe a que la germinación de las esporas es similar a la germinación de las semillas en cuanto a que la condición primaria para iniciar el proceso es la disponibilidad de humedad y la exposición a condiciones de luz y oscuridad que rompen la latencia (Azcón-Bieto & Talón, 2003; Ospina et al., 2015; Raven et al., 1986). En vez de marcos de madera, se pueden usar cajas acrílicas con sus tapas, igual que ocurre con el método convencional, las cuales cumplirán las funciones de protección de las esporas una vez sembradas, garantizar la humedad necesaria para la germinación, evitar pérdida de agua, y evitar que esporas ajenas a las de interés entren al sistema de siembra (Barros et al., 2008; Bernabe et al., 1999).

La tela se dividió en 6 cuadrantes equivalentes, y para estandarizar la siembra de las esporas, se propuso hacerlo por peso, colocando 0.12g de esporas por 100ml de agua desmineralizada, a cada cuadrante le correspondieron 16ml de la solución de esporas equivalentes a  $4.5 \times 10^5$  esporas por cuadrante.

### 7.13.3 Protocolos de esterilización

- Esterilización del sustrato del método convencional: el método más utilizado para la esterilización de los sustratos es usar calor para inactivar las esporas de hongos y eliminar bacterias comunes que podrían poner en riesgo los cultivos (The American Horticulture Society, 1999). Se humedeció el sustrato con agua hirviendo, dentro del contenedor con tapa en el cual se realizaría la siembra respectiva, y se esperó a que se enfriaran para la siembra. Durante 7 días se vigilaron para visualizar posibles brotes de hongos o bacterias.
- Esterilización del sustrato del método Feldhoff: en la actualidad muchos sustratos pueden tratarse, además de aplicar agua hirviendo al sustrato, sometiendo el mismo a al menos 10min en un microondas a máxima potencia (The American Horticulture Society, 1999). Se colocó la tela, luego de humedecer con agua hirviendo, en una bolsa plástica sellada y se sometió a 10min en el microondas. Una vez terminado el tiempo de microondas se colocó la tela y el algodón dentro de las cajas respectivas, se sellaron con las tapaderas y se esperó a que se enfriaran para la siembra. Durante 7 días se vigilaron para visualizar posibles brotes de hongos o bacterias.
- Esterilización de las esporas: para la esterilización de las esporas se tomó el protocolo de Pence (2015) y se le realizaron varias modificaciones, ya que se presentaron varios problemas con la contaminación en los diferentes intentos de siembra. La esterilización que tuvo mayor éxito fue al colocar las esporas dentro de papel filtro de cafetera, amarrado, y sumergiéndolas en Etanol 70% durante 15 minutos siendo agitado manualmente cada 5 minutos, seguido de hipoclorito de sodio al 4% (en forma de cloro comercial), junto a

2 gotas de Tween 20® (agente activo de superficie), por 15 minutos siendo agitado manualmente cada 5 minutos, y realizando 3 posteriores lavados en agua desmineralizada estéril de 10 minutos cada uno. Las modificaciones se basaron en diferentes proporciones, concentraciones y tiempos de exposición. En la sección de resultados se encuentran los porcentajes de rendimiento de estos, y el anexo 3 se detallan con su porcentaje de rendimiento.

- Esterilización para el protocolo *in vitro*: en el caso del material *in vitro* debe someterse a un auto clave para su esterilización. El tiempo mínimo recomendado es de 20 minutos, entre los 120 y 125°C y a 20 psi (Wu et al., 2009). Bajo estas condiciones se esterilizó el medio de cultivo, los instrumentos de laboratorio y agua desmineralizada que serían utilizados para las siembras, por 25 min.

#### 7.13.4 Comparación de las metodologías de propagación de helechos

La comparación de la nueva metodología propuesta se realizó por medio de dos tratamientos ampliamente conocidos para la propagación de las esporas de helechos: la metodología convencional, que no requiere equipo especializado de laboratorio y puede realizarse en cualquier instalación con herramientas comunes; y la metodología *in vitro*, la cual elimina todo problema que pueda surgir por factores exógenos, que podrían afectar el cultivo deseado. A continuación, se amplía la información de ambos métodos:

- Propagación convencional

Para la siembra de esporas por el método convencional se usaron cajas de acrílico de capacidad de 12L, un total de 5 por especie en cada caja de almacenamiento al igual que con la metodología propuesta. Se usó el sustrato de musgo de turba preparado con perlita con un pH de 6. Para estandarizar la siembra de las esporas,

se propuso hacerlo por peso, colocando 0.12g de esporas por 100ml de agua desmineralizada, a cada cuadrante le correspondieron 16ml de la solución de esporas equivalentes a  $4.5 \times 10^5$  esporas por cuadrante.

Se generó un protocolo de siembra por aspersión: las esporas fueron disueltas en 100ml de agua desmineralizada y con un agitador fueron tratadas para homogeneizar la mezcla. Una vez homogeneizada se tomaron alícuotas con jeringas comerciales de 5ml y se pasó a realizar la siembra por método de aspersión en cuadrantes ya establecidos en el sustrato.

Se propusieron estas cajas, ya que tienen el alto necesario para que las plantas jóvenes crezcan hasta los 10cm por lo que podrían establecerse dentro de las mismas y así en la subsiguiente fase de adaptación estar lo suficientemente grandes para no sufrir pérdidas por el cambio de condiciones. Tanto la nueva metodología propuesta como la convencional se trabajaron en una primera siembra en las instalaciones del Jardín Botánico CECON-USAC, y en una segunda siembra en un domicilio particular y con condiciones de luz natural y temperaturas ideales (18 °C-27°C) para los helechos, con un fotoperiodo promedio de 12 horas aproximadamente.

- Propagación *in vitro*

Los contenedores de las siembras fueron frascos de 9ONZ (250ml), cada uno con 50ml de medio del tipo M&S previamente preparado y estéril. Cada siembra se realizó en una campana de transferencia de flujo laminar, con ayuda de los instrumentos de cultivo de tejidos: espátulas de acero inoxidable, tijeras quirúrgicas de acero inoxidable y mechero para flamear los instrumentos entre cada siembra, pizetas con alcohol al 90% y al 70%, agua desmineralizada, porta instrumentos, una base de vidrio, papel periódico, toallitas de microfibra y bisturíes, todo previamente esterilizado. En total se trabajaron 10 frascos por especie en la siembra inicial. En las posteriores fases de propagación y crecimiento de los 10 frascos iniciales de

cada especie se hizo selección artificial, del material según sus características morfológicas: únicamente aquellos individuos más desarrollados fueron seleccionados para la siguiente fase de crecimiento. Este procedimiento se repitió a lo largo de las 40 semanas experimentación hasta el establecimiento de los esporofitos. El conteo de gametofitos fue el mismo que para el cultivo convencional por medio de la escala de Braun-Blanquet.

Este método se ejecutó en un primer intento durante el primer semestre del 2019 en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Agronomía -FAUSAC-, edificio T8, Ciudad Universitaria, zona 12, de la Universidad San Carlos de Guatemala. El segundo intento se realizó en el segundo semestre del mismo año en las instalaciones del Laboratorio de Investigación y Desarrollo, en el área de Cultivo *in vitro*, de la finca privada AGROSAK, perteneciente al Grupo TAK, localizado en el kilómetro 19.9 de la carretera a El Salvador. Ambos laboratorios cuentan con las condiciones necesarias tanto para la siembra como para las posteriores fases de propagación, crecimiento y establecimiento. En el anexo 1 se encuentran los manuales de elaboración de las soluciones madre. En el anexo 2 se encuentra el manual de elaboración de 1L de medio de cultivo M&S. En el anexo 4 se encuentra un resumen de los protocolos de desinfección evaluados.

#### 7.13.5 Validación de los métodos de germinación y establecimiento

Para la comparación de los métodos utilizados y la validación de la nueva metodología propuesta, se realizaron además pruebas con helechos de importancia ornamental. Estos cultivos son ampliamente utilizados en la horticultura por su valor comercial y su propagación por esporas está documentada apropiadamente, así como sus fenologías. Es decir que, si los 3 tratamientos que se aplicaron en esta investigación (el convencional, *in vitro* y la modificación Feldhoff) funcionan con el mismo porcentaje de rendimiento y eficacia, tanto para los helechos ornamentales como para los arborescentes elegidos, la metodología propuesta puede aplicarse para cualquier helecho, validando la propuesta. A continuación, se presentan las

especies ornamentales elegidas, por sus diferentes requerimientos, fenologías y niveles de dificultad de cultivo y mantenimiento.

- *Nephrolepis exaltata*:

Conocido comúnmente como cola de quetzal. Es un helecho de fácil manejo, ampliamente cultivado alrededor del mundo tanto de manera vegetativa, como por esporas; de fácil cuidado y amplio espectro de cultivo y desarrollo, es por mucho un helecho con el cual se puede empezar a ser un cultivador de estas plantas. Su reproducción de esporas es sencilla (Olsen, 2007). Estas muestras fueron recogidas de los helechos que se ubican a un lado de la sección de Euphorbias del Jardín Botánico CECON-USAC.

- *Asplenium antiquum*:

Conocido como nido japonés, nido de pájaro japonés o nido victoria. De origen tailandés, este helecho tiene amplio valor comercial y ha sido recientemente introducido al país. Es un helecho resistente una vez ya establecido, es de cuidado intermedio. Si no se controlan los niveles de humedad se puede llegar a la pudrición de las raíces y los frondes. Tiene muchas variedades creadas por medio de selección artificial. Es ampliamente trabajado en cultivo *in vitro* (Olsen, 2007). Estas muestras fueron recogidas de un helecho ornamental de dos jardines urbanos de la Ciudad de Guatemala.

- *Adiantum sp.*

Comúnmente conocido como culantrillo. Es un género de helecho de importancia comercial, de gran potencial ornamental debido a su belleza y frondes que no se asemejan a un helecho común. Su cuidado es para personas ya iniciadas en el arte del cultivo de helechos, aunque no necesariamente expertos. Se debe tener control

sobre la humedad del sustrato y del ambiente. Suelen ser susceptibles a cambios ambientales, sobre todo temperatura y humedad (Olsen, 2007). El género *Adiantum* cuenta con 30 especies nativas de Guatemala, que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el territorio nacional (Véliz, 2008). Para la primera siembra se usaron esporas del Biotopo del Quetzal, mientras que para la segunda siembra fueron tomadas en la Reserva privada ORQUIGONIA. Fueron manejadas por separado, ya que eran de especies diferentes.

### 7.14 Etapas de crecimiento

Para poder tener puntos de comparación entre los métodos a ejecutar se tomaron los estándares propuestos por Barros et al., (2008), Bernabe et al., (1999) y Rünk & Zobel, (2009) en los cuales se obtuvieron 4 fases de desarrollo basados en las diferentes etapas de desarrollo desde una espora hasta un esporofito. En la tabla 1 se observan las fases propuestas.

Fase	Etapas de desarrollo*	Evaluación Visual
0	Esporas	Esporas
1	Inicio de la germinación	Puntos verdes
2	Gametofitos inmaduros	Inicio del desarrollo de la estructura cordiforme
3	Gametofitos maduros	Estructuras cordiformes de diferentes tamaños
4	Esporofitos	Esporofitos jóvenes

**Tabla 1. Fases de desarrollo.** Se observan las fases de desarrollo desde una espora hasta un esporofito. Cada etapa inicia cuando el primer individuo muestra un cambio. \*Las etapas pueden estar simultáneamente en una misma unidad experimental ya que cada individuo tiene un desarrollo diferente. Adaptado de (Barros et al., 2008; Bernabe et al., 1999; Rünk & Zobel, 2009)

## **7.15 Eficacia de los métodos**

### 7.15.1 Definición de eficacia:

Para poder evaluar la eficacia de la nueva metodología propuesta se deben evaluar: el tiempo de germinación, el tiempo de generación de los esporofitos, número total de organismos al final del tiempo establecido de 40 semanas y además la relación entre el costo del método y el beneficio obtenido.

Para establecer la eficacia de los métodos, se tomaron en cuenta los criterios de:

- El tiempo de germinación: en días, como indicador de la viabilidad de las esporas y la eficacia de los tratamientos para guardar la humedad necesaria para su germinación.
- El tiempo de formación del primer esporofito: en días, como indicador del éxito de la germinación de las esporas y el establecimiento de los gametofitos.
- El tiempo de establecimiento: en días hasta el final del experimento o bien hasta que los organismos tengan al menos quince frondes, o midan 10cm en su fronde más largo.
- Número total de organismos establecidos: como indicador del mejor medio de cultivo tanto de germinación como de establecimiento.
- La relación entre el costo del método y el beneficio obtenido: por medio de los gastos realizados para cada uno de los métodos, posibilidad de reutilización del material y el número de individuos que finalmente pueden ser trasplantados a pilones, ya sea con fines de conservación o bien para su posterior comercialización.

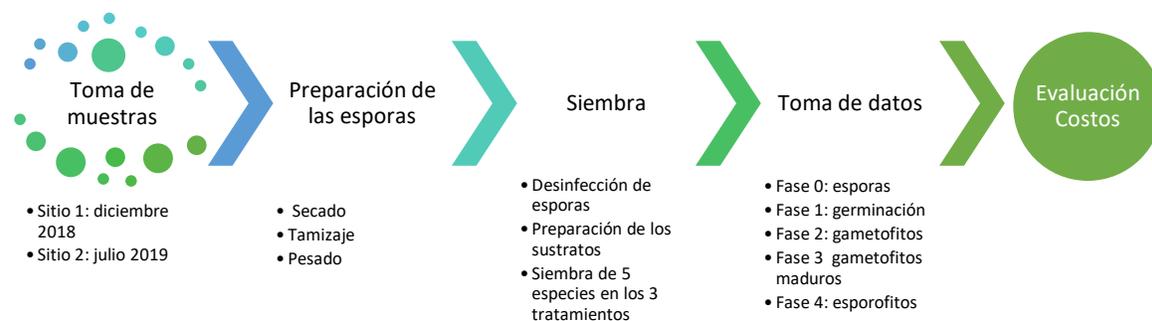
## **7.16 Relación costo/beneficio**

Finalmente se realizó un recuento de los gastos generados por cada uno de los métodos, incluyendo el gasto de la obtención de muestras, manejo de éstas, material de laboratorio, y cada uno de los ítems a tomar en cuenta para la inversión

del montaje y mantenimiento de cada tratamiento. En este aspecto se tendrá en cuenta la eficacia del método, para así poder establecer qué método no sólo es el más eficaz, sino cuál es viable para la posible implementación de programas de conservación, propagación y educación ambiental en las comunidades, como un primer esfuerzo de acercamiento para el manejo de poblaciones de helechos en Guatemala. En la figura 8 se muestra un esquema simplificado de los procesos de la presente investigación.

### 7.17 Inferencias en el posible uso de la nueva metodología

Una vez obtenida la nueva metodología y los resultados de la comparación con los otros tratamientos, se pasó a identificar los posibles campos de trabajo, en base a la eficacia y la relación costo/beneficio, para poder establecer costos de producción para futuros proyectos de conservación y restauración del bosque nuboso guatemalteco.



**Figura 8. Proceso de siembra y toma de datos para la validación de las metodologías evaluadas.** Se observa un esquema simplificado del proceso de investigación.

### 7.18 Análisis estadísticos

Además de calcular la relación costo/ beneficio de los métodos, fueron comparados los tratamientos para poder establecer ventajas en cuanto al tiempo de germinación, éxito de ésta, número de individuos logrados y éxito del establecimiento. Como se mencionó antes se hicieron 5 repeticiones por especie en el caso del método convencional de siembra. 5 repeticiones por especie también para el método en base a las modificaciones de Feldhoff. 10 repeticiones por especies como siembra inicial para el cultivo *in vitro*.

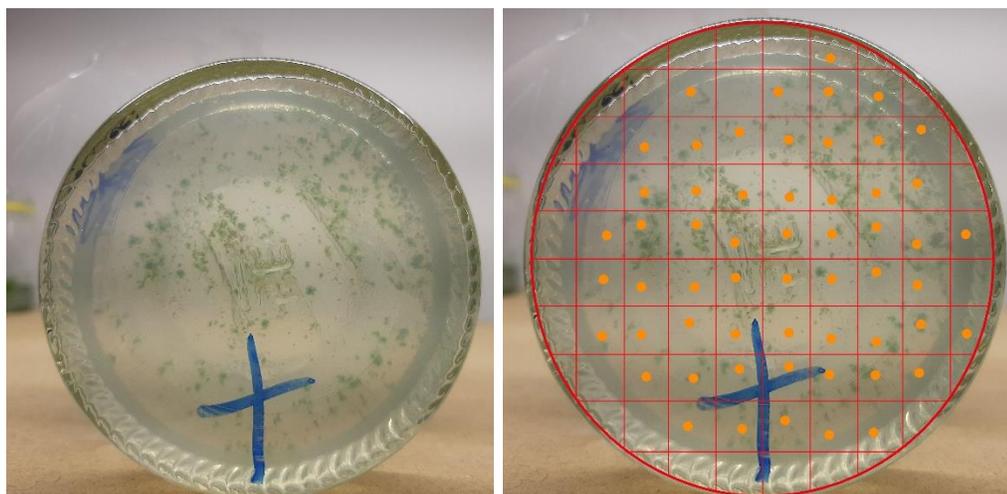
Al momento de germinar las esporas se aplicó la modificación del índice de cobertura de Braun-Blanquet (Narvárez-Parra et al., 2013; Ramírez, Pérez-García, & Riba, 2000; Reyes et al., 2019; Turner, Gardner, & O’neill, 2001), en la cual se calcula el índice de germinación de las esporas de manera indirecta, de acuerdo a la distribución espacial de los gametofitos en el medio o unidad de cultivo. La escala Braun-Blanquet utilizada fue la siguiente:

Significado	Porcentaje de germinación (%)
No se observan individuos por lo que no hubo germinación	0
Pocos individuos no dispersos	<5
Pocos individuos y dispersos entre sí	≤5
Numerosos individuos que cubren 5% del área sean dispersos o no	5
Cualquier número de individuos que cubren del 5% al 25% del área	5.1 - 25
Cualquier número de individuos que cubren del 25% al 50% del área	25.1 - 50
Cualquier número de individuos que cubren del 50% al 75% del área	50.1 - 75
Cualquier número de individuos que cubren 75% o más del área	≥ 75

**Tabla 2. Índices de germinación según la escala adaptada de Braun-Blanquet.** Se observa una guía valorativa del porcentaje de germinación según el área que ocupan los gametofitos en el área de cultivo. Adaptado de Narvárez-Parra et al., (2013).

La evaluación para el índice de Braun-Blanquet se realizó por medio de la toma semanal de fotografías a las unidades experimentales. Las fotografías tomadas con un lente Micro Nikkor 40mm permitió el conteo de los gametofitos generados en la

fase de germinación, así como en las fases 1 a 3. También permitió observar con detalle las fases de desarrollo y el crecimiento de los esporofitos. Las fotografías fueron procesadas en Adobe® LightRoom® CC ver. 15.8 y Adobe® Photoshop® CC ver 15.6 con el fin de resaltar los tonos verdes, verde-azulados y verde-amarillos y así distinguir los gametofitos de las partículas de sustrato, las imperfecciones de la tela y resaltarlos en el medio de cultivo. También se añadió una grilla digital correspondiente al área de siembra. Se contó manualmente cada unidad de la grilla digital en las fotografías para establecer el porcentaje de germinación de las esporas. En la figura 9 se encuentra un ejemplo de las grillas digitales utilizadas durante el proceso de análisis de resultados de una unidad experimental *in vitro*.



**Figura 9. Ejemplo de las fotografías semanales.** Izq. Vista del fondo de un frasco de *S. horrida*. Der. en la vista inferior, por medio de una grilla digital puede establecerse el porcentaje de germinación. Cada subunidad de la grilla representa el 1.15%. Datos experimentales obtenidos en el laboratorio de CT de AGROSAK. Km19.9 carretera a El Salvador, Guatemala.

En cuanto a los análisis estadísticos se hizo un análisis de porcentaje de rendimiento de los procesos de desinfección de las esporas. Un análisis de porcentaje de germinación acumulada semanalmente en base al índice Braun-Blanquet y el análisis de las fotografías semanales para los tres tratamientos. Un

análisis de las fenologías obtenidas en base a las cuatro fases propuestas, tomando como el cambio de una etapa cuando al menos una subunidad presentó por primera vez el cambio. Se realizó una comparación de los costos de producción para los tres métodos y se calculó el porcentaje de costos de los esporofitos obtenidos al final de las 40 semanas de experimentación.

## **8 Resultados**

### **8.9 Colectas**

#### 8.9.1 Biotopo para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera”:

La colecta de los helechos del BUCQ se realizó el 2 de diciembre de 2018. En este caso se eligieron tres individuos de *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* de interés localizados en diferentes puntos a lo largo del sendero interpretativo “Los Helechos” y un único individuo de la especie *Sphaeropteris horrida*, localizado en la entrada de las instalaciones, cerca de la placa conmemorativa de Mario D. Rivera. En todos los casos se cortó un único fronde de cada uno con ayuda de una guacamaya extensible.

Las secciones de pinas y pinnulas fueron colocadas en sobres de papel manila propiamente identificados para secarlos posteriormente en la ciudad capital. En la figura 10 se observa un grupo de fotografías del procedimiento de colecta en el BUCQ durante el mes de diciembre de 2018.

#### 8.9.2 Reserva Natural Privada: ORQUIGONIA

En la Reserva Natural Privada ORQUIGONIA, se realizó la colecta en el mes de julio del 2019. Se eligieron tres individuos de cada especie de los helechos arborescentes de interés elegidos dentro del sendero interpretativo de la reserva,

así como en las instalaciones administrativas y recreativas. En todos los casos se cortó un único fronde de cada uno con ayuda de una guacamaya extensible.

Las secciones de pinas y pinnulas fueron colocadas en sobres de papel manila propiamente identificados para secarlos posteriormente en la ciudad capital. En la figura 11 se observa un grupo de fotografías del procedimiento de colecta en ORQUIGONIA durante el mes de julio de 2019.



**Figura 10. Colecta realizada en el BUCQ.** Izq. sup.: colecta de *C. divergens* var. *tuerckheimii* con la guacamaya extensible. Derecha sup.: proceso de división de un fronde. Izq. inf.: preparación de un fronde de *S. horrida*. Der. inf.: prensa botánica para los especímenes de herbario.

### 8.9.3 Esporas de las especies ornamentales para la validación

- *Nephrolepis exaltata*: Comúnmente conocido como cola de quetzal. Estas esporas fueron recogidas de una sección del Jardín Botánico CECON-USAC. Se cortaron un total de 31 frondes maduros, con al menos 45cm de largo

cada uno. Se seccionaron y se colocaron en sus sobres respectivos, y se sometieron al secado correspondiente.



**Figura 11. Colecta realizada en ORQUIGONIA.** Izq: helecho *S. horrida* localizado en el área recreativa de la reserva. Der. Preparación de uno de los frondes para herborización.

- *Asplenium antiquum*: se colectaron diez frondes de dos especímenes de colección personal. Seis frondes de un ejemplar perteneciente a la Familia Palomo, que se encuentra en su residencia particular en la zona 11 capitalina. Y cuatro frondes de una planta de colección de la Licda. Roselvira Barillas con residencia en la zona 12 capitalina. Se seccionaron y se colocaron en sus sobres respectivos, y se sometieron al secado correspondiente.
- *Adiantum sp.*: se realizaron 2 colectas para este helecho. La primera se realizó en conjunto con los helechos arborescentes del Biotopo del Quetzal en diciembre de 2018. Una segunda colecta se realizó en ORQUIGONIA en julio de 2019. Lo anterior se debe a la baja producción de esporas de este

género por fronde. En la primera colecta se obtuvieron 11 frondes maduros de 3 individuos; en la segunda colecta se obtuvieron 15 frondes de 6 individuos en total. Ya que no pertenecían a la misma especie, estas esporas se manejaron por separado, y las primeras esporas se usaron para las primeras pruebas y las últimas para la segunda fase de siembras. Se seccionaron y se colocaron en sus sobres respectivos, y se sometieron al secado correspondiente.

### **8.10 Esporas**

Luego de que los frondes fueran colectados y seccionados en campo, las pinnas y pinnulas fueron colocadas en sobres de papel manila identificados. Se colocaron en una ventana a la que le da el sol directo durante 6 horas al día, durante 30 días. Terminado el proceso de secado de pinnas y pinnulas, los sobres contenían las esporas deseadas. Sin embargo, para algunas especies fue necesaria la extracción manual de las mismas. En la figura 12 se observa el proceso de extracción de las esporas.

Una vez pesadas y extraídas las esporas, los excedentes fueron colocados en recipientes para mantenerlos en un lugar fresco y seco, a temperaturas menores de 30°C y lejos de la luz directa. Las esporas ya pesadas fueron colocadas en sobres de papel encerado previamente preparados, cada uno conteniendo 0.12g.

Se observó que la especie *S. horrida* tiene una gran producción de esporas por fronde. Se obtuvo un promedio de 4.86g por cada uno. Así mismo *Nephrolepis exaltata* es la especie que menor cantidad de esporas produce por fronde, seguido de *Adiantum*. En el caso del nido de pájaro (*Asplenium antiquum*) se colectaron los diez frondes de dos individuos, ya que existen pocas plantas en la ciudad de Guatemala, debido a su reciente introducción al país como planta ornamental, sin embargo estos diez frondes aportaron 17.24 gramos de esporas, con un promedio

de 1.72g por cada uno. En la tabla 3 se observan los gramos obtenidos luego de la extracción de las esporas.



**Figura 12. Proceso de extracción de esporas.** Izq sup: se observan las herramientas para la extracción manual de las esporas: cuchilla, pinzas, agujas de disección, espátulas, calculadora, pesa portátil y sobres de papel encerado previamente preparados. Izq. inf. Banco de esporas en sus respectivos frascos identificados. Der. extracción de esporas de *Asplenium antiquum*.

Especie	Total de frondes colectados*	Gramos de esporas obtenidos*	Promedio de gramos por fronde**	Cantidad de esporas aproximadas***
<i>Cyathea divergens</i> var. <i>tuerckheimii</i>	6	8.01	1.335	$2.403 \times 10^9$
<i>Sphaeropteris horrida</i>	4	19.45	4.8625	$5.835 \times 10^9$
<i>Adiantum</i> sp.	26	9.15	0.3519	$2.745 \times 10^9$
<i>Nephrolepis exaltata</i>	31	12.18	0.3929	$3.645 \times 10^9$
<i>Asplenium antiquum</i>	10	17.24	1.724	$3.009 \times 10^9$

\*Se incluyen los frondes de ambas colectas. \*\* Se incluyen los gramos obtenidos en ambas colectas.

\*\*\* cantidad de esporas aproximadas bajo el estándar de 300 millones de esporas por gramo

**Tabla 3. Gramos de esporas obtenidos durante las colectas realizadas.** Se observa que aún de pocos frondes se pueden obtener grandes cantidades de esporas, las cuales tienen la misma probabilidad de germinar y generar nuevos helechos.

## **8.11 Protocolos de Esterilización y Desinfección**

### 8.11.1 Sustrato convencional

El éxito en la esterilización del sustrato de peat-moss preparado el 100% en las 2 siembras. Para comprobar el éxito de la esterilización se dejaron pasar 7 días para observar si había crecimiento de algún agente patógeno.

### 8.11.2 Sustrato Feldhoff

El éxito en la esterilización del sustrato de algodón y tela fue del 100% en las 2 siembras. Para comprobar el éxito de la esterilización se dejaron pasar 7 días para observar si había crecimiento de algún agente patógeno.

### 8.11.3 Medio de cultivo para siembra *in vitro*

Se elaboró y esterilizó todo el material para la siembra *in vitro*. Los frascos estériles se dejaron por 5 días para observar si había crecimiento de algún patógeno. El rendimiento fue del 100% de éxito.

## **8.12 Siembra**

Las siembras fueron divididas en dos fases. La primera fase corresponde a las primeras pruebas realizadas durante el primer semestre del 2019 en el Jardín Botánico CECON-USAC y en la Facultad de Agronomía. Mientras que la segunda fase se llevó a cabo en mi residencia particular, y en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la Finca Privada AGROSAK. Esto se debió a complicaciones en las siembras de la primera fase, en diferentes etapas de la siembra. A continuación, se describen cada una de las fases correspondientes.

### 8.12.1 Siembra 1: Jardín Botánico

La siembra se realizó en las instalaciones del invernadero del jardín Botánico CECON-USAC (JB) ubicado al final de la Avenida Reforma, zona 10 capitalina, ciudad de Guatemala, durante el mes de abril de 2019. En esta ocasión se esterilizó el sustrato de manera exitosa, pero no se desinfectaron las esporas, pues en la literatura revisada, no había un protocolo de desinfección para el método convencional de siembra y tampoco había un protocolo establecido para la nueva metodología propuesta. En la figura 13 se observa el procedimiento de preparación y el montaje del experimento.

Durante esta siembra se observó que empezaron a desarrollarse hongos y bacterias en ambos métodos de siembra. En la siembra convencional el sustrato de peat-moss preparado presentó mal olor y cambios de textura y coloración durante la primera semana. Se procedió a la aplicación de Streptol compuesto y alcohol al 70% para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias. Tras 3 semanas de controles se dio por perdido el experimento. Ocurriendo un proceso similar con el medio sintético de tela y algodón.

Con ayuda de los Dataloggers se controlaron las condiciones de temperatura y humedad registrándose temperaturas por encima de los 30°C sobre todo en el rango del medio día (11:00 h – 14:00 h) en la tabla 4 se muestran las temperaturas registradas durante el periodo que duró la primera siembra. Los hongos y bacterias que provenían desde la colecta de las esporas fueron los responsables de la contaminación de los sustratos, y junto al calor y la humedad de las altas temperaturas del invernadero del JB iniciaron el proceso de degradación de los sustratos.

Los hongos se caracterizan por formaciones de tipo algodonoso de colores variados, que incluyen blanco, crema, verde (en diferentes tonos) y negro, las fibras observadas corresponden al micelio del hongo en crecimiento. La contaminación por bacteria incluye diferentes conglomeraciones de texturas ligosas o pegajosas, acuosas o simplemente como manchas de coloraciones

muy variadas, además de poseer olores desagradables y fuertes (Brown, 2001; Cappuccino & Sherman, 2014; Pepper & Gerba, 2004; Sharry et al., 2015).

Fecha	Temperatura Promedio (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)
3/05/2019	23.10	33.50	18.26
4/05/2019	23.18	34.30	16.66
5/05/2019	23.12	31.50	18.98
6/05/2019	23.77	35.24	18.90
7/05/2019	23.50	33.94	18.64
8/05/2019	23.58	34.30	19.16
9/05/2019	24.18	34.30	18.64
10/05/2019	22.90	33.14	19.08
11/05/2019	23.45	33.54	18.44
12/05/2019	23.85	34.84	18.26
13/05/2019	23.95	32.54	18.54
14/05/2019	23.43	29.48	20.42
15/05/2019	23.14	31.22	20.02
16/05/2019	21.13	27.82	19.24
<b>Promedios</b>	23.31 (0.72)	32.83 (2.13)	18.80 (0.87)

**Tabla 4. Datos de Temperatura y Humedad del Jardín Botánico.** Se observan los datos obtenidos durante el periodo de prueba del Jardín Botánico. Las temperaturas máximas, que corresponden a las horas del mediodía, superaron los 30°C, algo perjudicial para el cultivo y razón por la cual este primer intento de siembra falló.

Debido a lo anterior se procedió a movilizar tanto la prueba convencional como la del método Feldhoff a otro lugar. Se eligió una residencia particular. En la figura 14 se observan dos cajas contaminadas.



**Figura 13. Preparación de la siembra en el Jardín Botánica CECON-USAC.** Izq sup: caja preparada con el sustrato Feldhoff. Der.sup. preparación de una caja con sustrato Feldhoff, con 3 capas de algodón quirúrgico, y 2 capas de tela de ojo de perdiz, también 100% algodón. Izq. inf. Caja preparada con sustrato de musgo de turba con perlita y vermiculita. Der.inf. cajas ya listas en las instalaciones del Jardín botánico CECON-USAC-.



**Figura 14. Contaminación de las pruebas realizadas en el Jardín Botánico.** Izq, contaminación en una caja del método Feldhoff. Der. Contaminación en una caja de la siembra convencional. Las conglomeraciones blanquecinas algodonosas fueron causadas por hongos, mientras que aquellas de colores fuertes y de textura ligosa o pegajosa fueron causadas por bacterias.

### 8.12.2 Siembra en la Facultad de Agronomía

Se realizó una primera siembra del método *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía -FAUSAC-, Edificio T8, Ciudad Universitaria, zona 12, de la Universidad San Carlos de Guatemala. La siembra se realizó el 29 de abril del 2019. En la figura 15 se observa el proceso de siembra *in vitro*. Se sembraron un total de 50 frascos, 10 repeticiones por especie.

Se dio seguimiento 1 vez a la semana por 4 meses. Durante este tiempo se contaminaron 7 frascos de la especie *Asplenium antiquum*, que se extrajeron del área de crecimiento en la primera semana de revisión (06/05/2019). En la figura 16 se observa un ejemplo de contaminación por hongos en un cultivo *in vitro*. Esta contaminación se debió a una falla con el protocolo de desinfección, sin embargo el resto de los frascos no presentó anomalías. El porcentaje de rendimiento de esta desinfección fue del 86% en la primera semana.



**Figura 14. Siembra *in vitro* en FAUSAC.** Izq. sup. Área de crecimiento con un total de 50 frascos sembrados. Der. sup. Frasco sembrado con esporas de *S. horrida*. Izq. inf. Área de trabajo en la campana de flujo laminar.

El resto de los frascos quedó intacto hasta la semana 7 de revisión, en la cual se extrajeron 5 frascos: 3 de *Nephrolepis exaltata* y 2 de *Adiantum*. Estas extracciones tardías se debieron a una plaga de ácaros en el laboratorio de FAUSAC. Los ácaros dejan caminos de contaminación, en su mayoría bacterias, que transportan en sus patas. Es fácilmente identificable por los patrones que pueden formar en los frascos. FAUSAC ejecutó una fumigación y la plaga de ácaros se mantuvo bajo control hasta que en la semana 16 (112 días) se decidió finalizar con esta prueba, ya que está documentado que la germinación de las esporas rara vez sobrepasa las 14 semanas (98 días). Se concluyó que el protocolo de desinfección fue muy agresivo e inhibió a las esporas, pues el hipoclorito utilizado superaba el 4% v/v.



**Figura 16. Contaminación por hongos en un cultivo *in vitro*.** Se observa uno de los frascos contaminados de *Asplenium antiquum*. La contaminación algodonosa determina que el frasco estaba contaminado con hongos.

### **8.13 Siembra en residencia particular**

La siembra en la residencia particular se realizó el 26 de mayo de 2019. Después del lavado, desinfección, reposición de sustratos y material del intento fallido en el Jardín Botánico CECON-USAC. Se cambió la marca del sustrato para el método convencional, y se compró peat-moss preparado previamente con un pH estandarizado a 5.9, garantizado por el proveedor, inerte y estéril. Así mismo se reemplazó el material para el método adaptado de Feldhoff y se procedió a esterilizar los sustratos y cajas una semana antes de la siembra. A continuación, se presentan los resultados de las siembras en esta segunda fase.

### 8.13.1 Convencional y nuevo método propuesto.

En esta ocasión se aplicó una desinfección a las esporas previa a la siembra. En base a los resultados obtenidos previamente se ajustaron los tiempos de exposición y las concentraciones de los agentes desinfectantes. Se estableció que las esporas serían expuestas por 15 minutos a etanol 70% seguido de hipoclorito de sodio 4% v/v por 15 minutos más, y por último 3 lavados de 10min cada uno con agua potable previamente hervida. El método por aspersión de las semillas fue ideal para la siembra, el manejo de las unidades experimentales fue sencillo y sin complicaciones.

Una vez realizada la siembra se les dio seguimiento por ocho semanas, dos veces por semana para observar cualquier tipo de cambio, incluyendo contaminación y/o germinación. En la figura 17 se observa el espacio designado para la prueba. El cuarto tenía una ventana donde entró la luz por un rango de 10 a 12 horas diarias, con temperaturas estables entre los 16°C y los 26°C durante las 40 semanas de duración de las pruebas.



**Figura 17. Segunda siembra de los métodos convencional y Feldhoff.** Se observa que las unidades experimentales son fácilmente apilables, ocupando menor cantidad de espacio y optimizando los recursos.

#### **8.14 Siembra in vitro en AGROSAK**

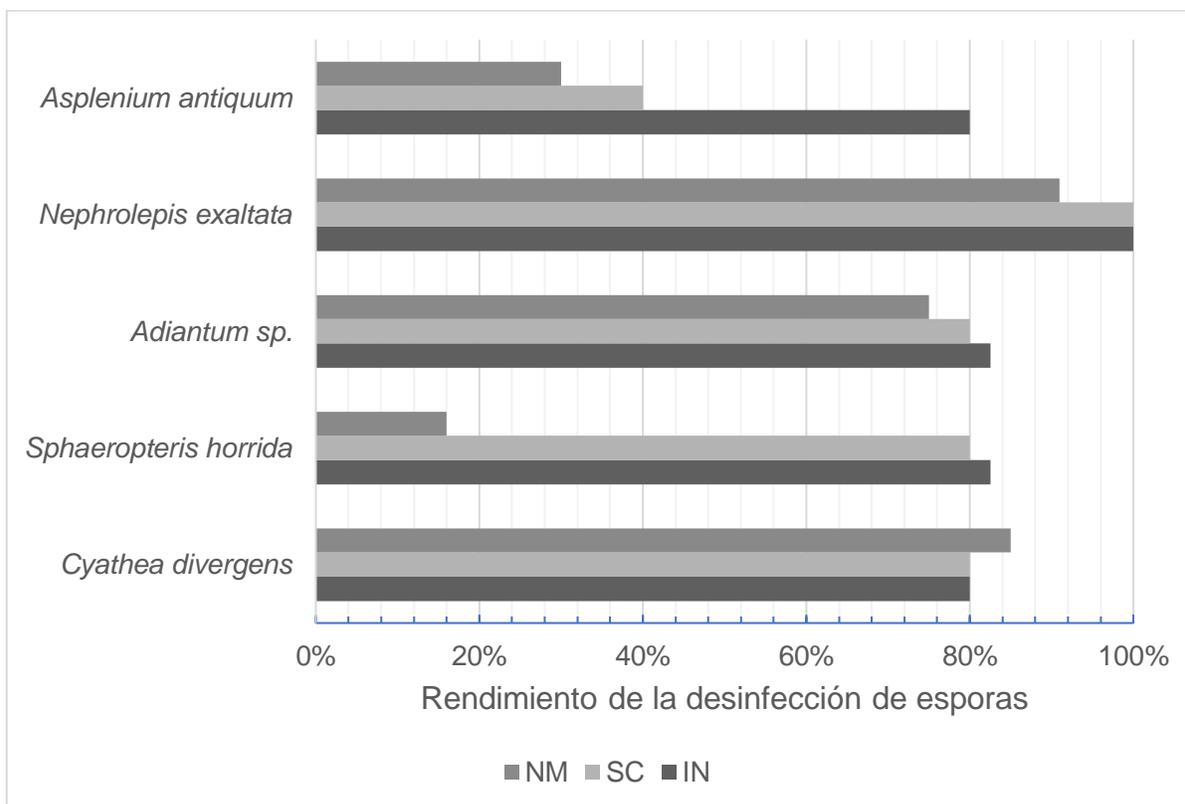
La segunda fase *in vitro* se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la finca AGROSAK, de la Corporación TAK Centroamérica. Se realizaron varios ensayos para el protocolo de desinfección de las esporas para la siembra *in vitro*, ya que los protocolos presentados en la literatura no indicaban el porcentaje de éxito o el rendimiento de estos. Se concluyó que la desinfección de las esporas debía ser similar al protocolo para la siembra convencional, con 15 minutos de exposición de las esporas a etanol al 70%, seguido de hipoclorito de sodio 4% v/v pero se le añadió 2 gotas de Tween 20® por cada 80ml de hipoclorito de sodio. El Tween es un agente tensoactivo que mejora la dispersión de los agentes desinfectantes, por lo que se garantizó que las esporas estuvieran en contacto directo con el cloro. Finalmente se procedió a dar tres lavados de agua estéril. Todo el procedimiento se realizó dentro del espacio de siembra de la campana de flujo laminar, con equipo y cristalería estéril.

#### **8.15 Resultados de la desinfección de esporas**

La desinfección de las esporas se tuvo que intentar en reiteradas ocasiones para los tres métodos, sin embargo, la combinación de etanol al 70%, junto con hipoclorito de sodio 4% v/v y el tensoactivo tuvo un buen rendimiento en la segunda fase de pruebas.

En la figura 18 se observa el rendimiento de la desinfección de las esporas para los tres tratamientos. El rendimiento global del protocolo de desinfección para los 3 tratamientos fue del 73%. Sin embargo, cada lote de esporas presentó comportamiento diferente en todas las unidades experimentales. El método con mayor cantidad de contaminación fue el nuevo método propuesto (NM), seguido de la siembra convencional (SC) y el método con menor contaminación fue el *in vitro* (IV). Así mismo, cada especie se comportó de manera diferente en cada

método, por lo que no hay una relación entre la especie y el rendimiento de la desinfección.



\*NM= siembra nueva metodología; SC = siembra convencional; IN= siembra *in vitro*.

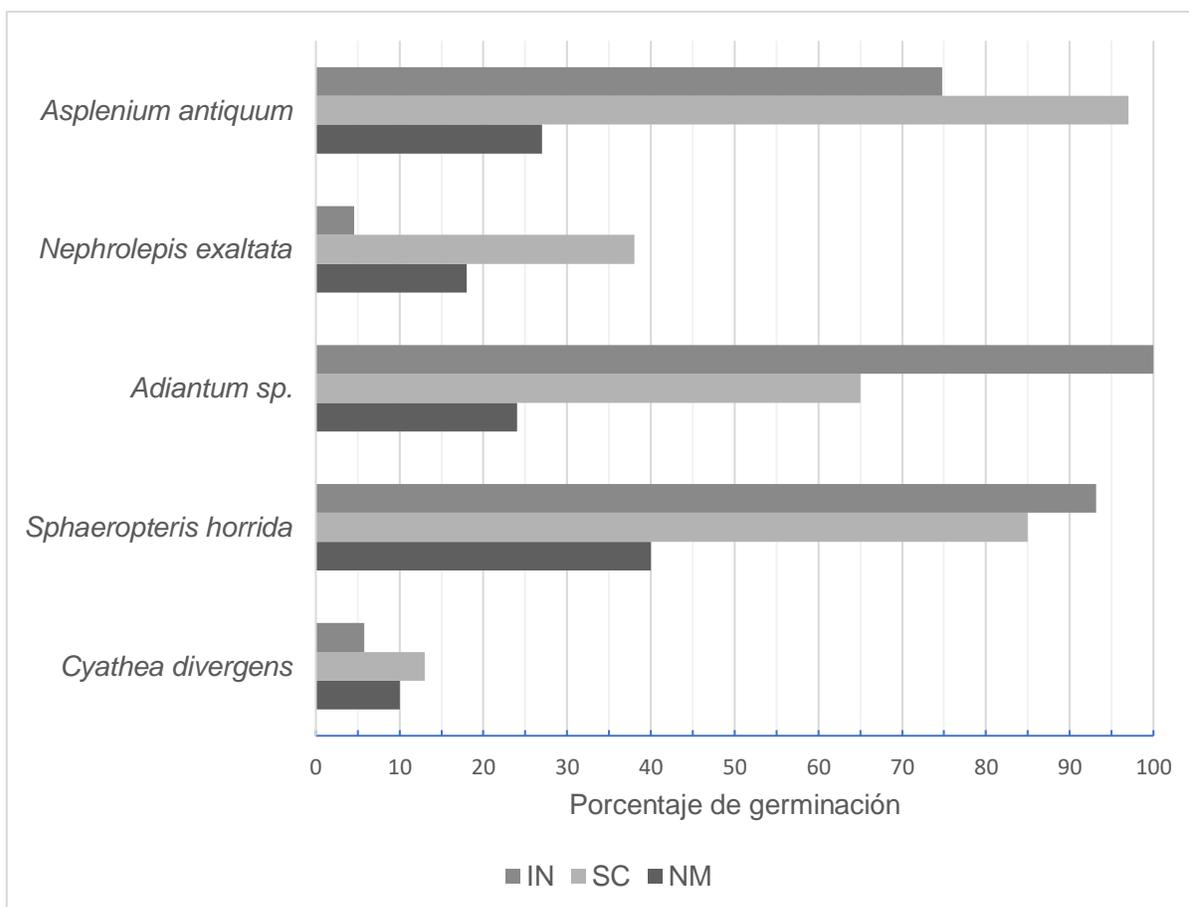
**Figura 18. Rendimiento de la desinfección de esporas.** El protocolo de desinfección de esporas fue exitoso con un rendimiento global del 73% para todos los métodos. No se evidenció una relación directa entre la especie y el rendimiento de desinfección por tratamiento, así como tampoco entre los tratamientos y los lotes de esporas sembrados por unidad experimental.

## 8.16 Resultados de la germinación y fenología

### 8.16.1 Porcentajes de germinación

La germinación se dio en todos los métodos para las cinco especies evaluadas. En la figura 19 se observan los porcentajes de germinación alcanzados por tratamiento. El método *in vitro* fue el más exitoso alcanzando hasta el 100% de germinación en

las unidades de siembra para *Adiantum* sp. Seguido del 93.15% para *S. horrida* y 74.75% para *A. antiquum*. Las tres especies tienen también en común que fueron las que obtuvieron mejor germinación en los tres tratamientos. Para *C. divergens* y *N. exaltata* los rendimientos fueron los más bajos, siendo *C. divergens* la especie con menores porcentajes de germinación.



\*IN= siembra *in vitro*; SC = siembra convencional; NM= siembra nueva metodología.

**Figura 19. Porcentajes de germinación alcanzados.** La germinación se presentó en los tres tratamientos para las 5 especies evaluadas. *Adiantum sp.*, *S. horrida* y *A. antiquum* obtuvieron buenos porcentajes de germinación en los métodos evaluados. *N. exaltata* y *C. divergens* no obtuvieron buenos resultados.

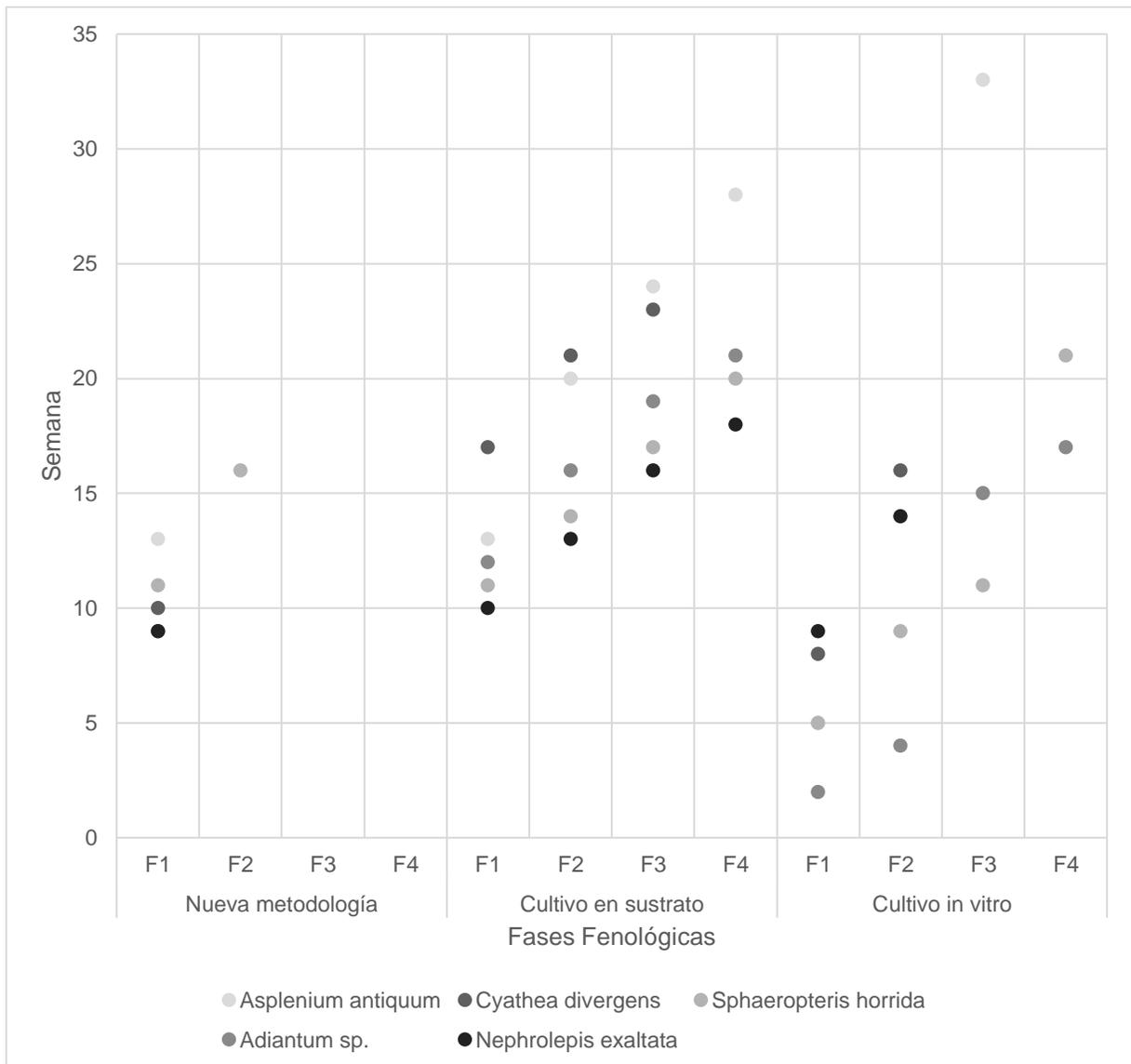
El tratamiento con menores porcentajes de germinación para todas las especies fue el del sustrato sintético, seguido del sustrato convencional. El cultivo *in vitro* obtuvo los mejores porcentajes de germinación para todas las especies. En la sección de fenologías se evalúan las fases de crecimiento. Y en la sección de esporofitos generados se evalúa el total de individuos diferenciados por especie por tratamiento.

#### 8.16.2 Fenologías

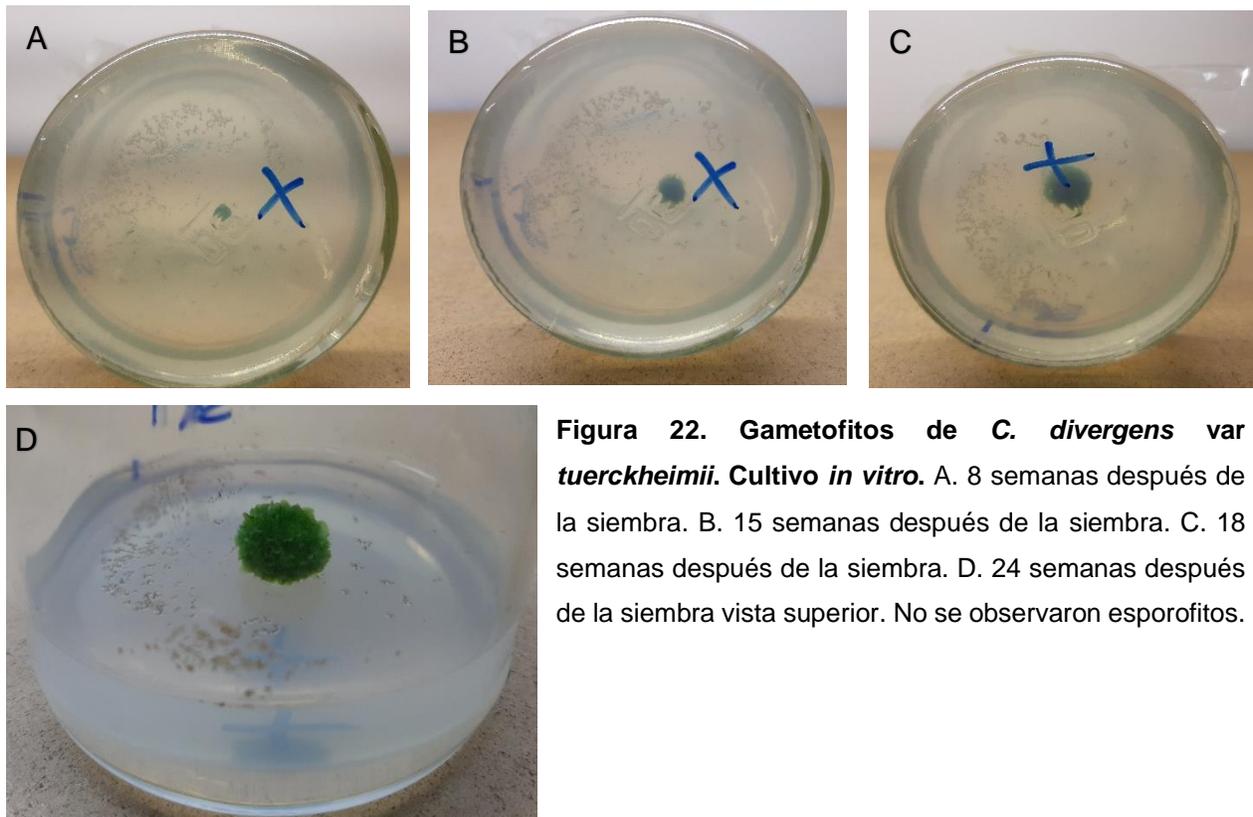
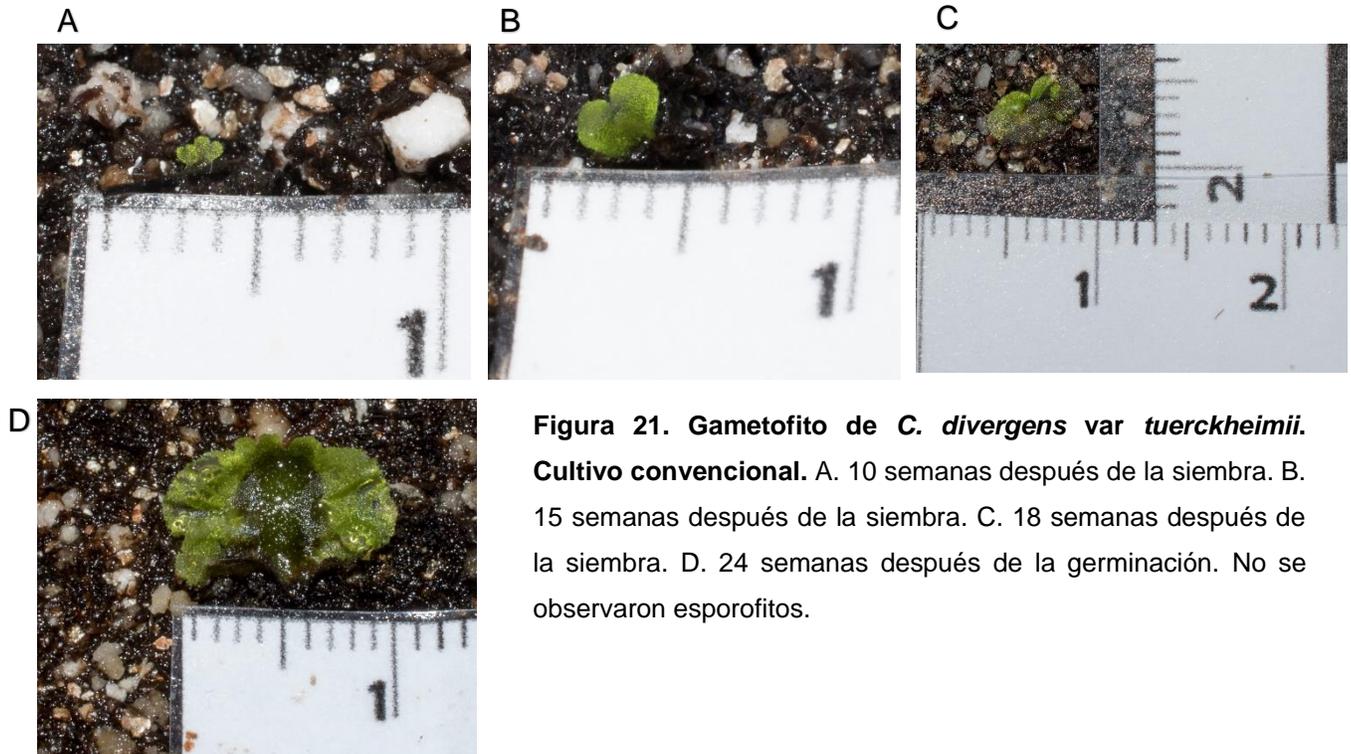
Se procesaron un total de 10,955 fotografías para evaluar las fenologías. En los tres tratamientos evaluados todas las especies germinaron y alcanzaron la fase 1 de desarrollo en las primeras 16 semanas después de la siembra. Sin embargo en las posteriores fases no fue así. En la figura 20 se observan las fenologías por especie por tratamiento. En este caso se presenta la semana inicial en que se observó el cambio de fase en al menos 1 subunidad experimental, puesto que una vez una unidad presentaba el cambio, la tendencia fue que en los siguientes días las demás unidades y subunidades a su vez alcanzaron la siguiente fase de desarrollo.

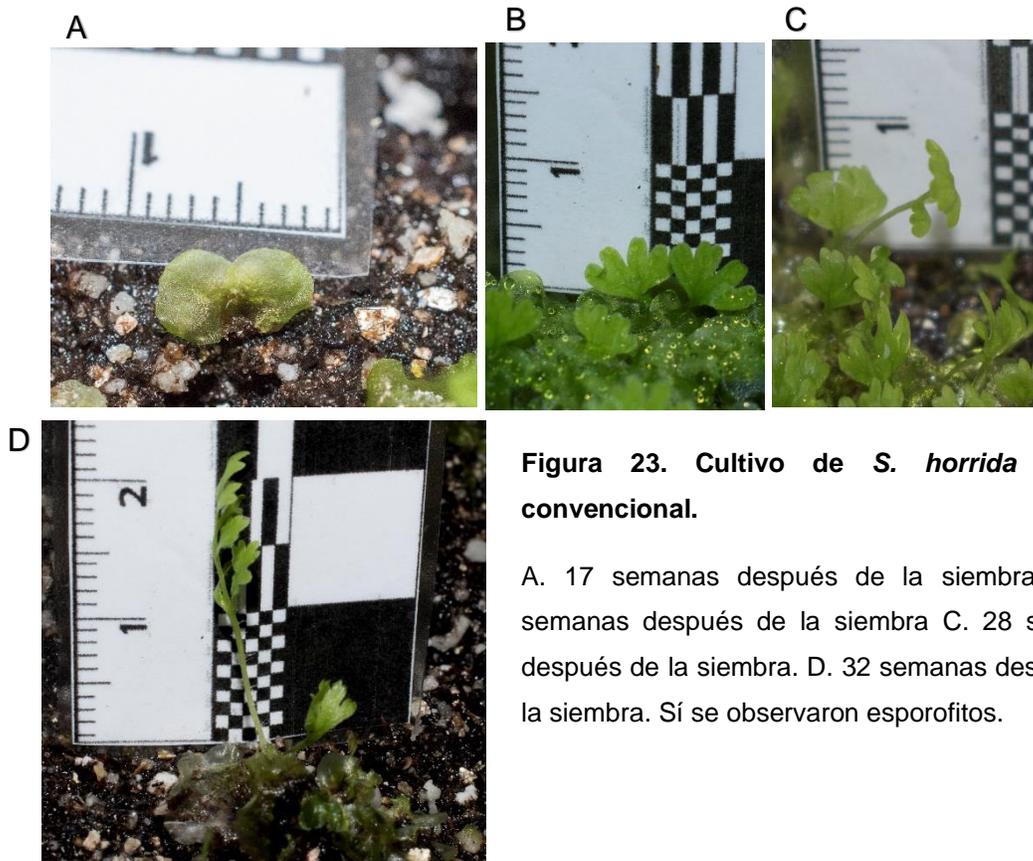
Para el cultivo *in vitro* la germinación ocurrió varias semanas antes que con los demás tratamientos para todas las especies, esto junto a la ventaja de altos porcentajes de germinación hacen del cultivo *in vitro* ideal en las primeras fases de desarrollo. Sin embargo, se observa también en la Figura 20 que la diferenciación ocurrió para todas las especies en el cultivo con sustrato sin la necesidad de una separación de individuos o de manipular los cultivos de ninguna manera, esto le confiere al cultivo en sustrato la ventaja del desarrollo e los organismos sin el riesgo de contaminación o pérdidas por mal manejo del cultivo en las etapas tempranas de los organismos.

En las figuras 21, 22, 23, 24, 25 se observan diferentes etapas de desarrollo de cada una de las especies.



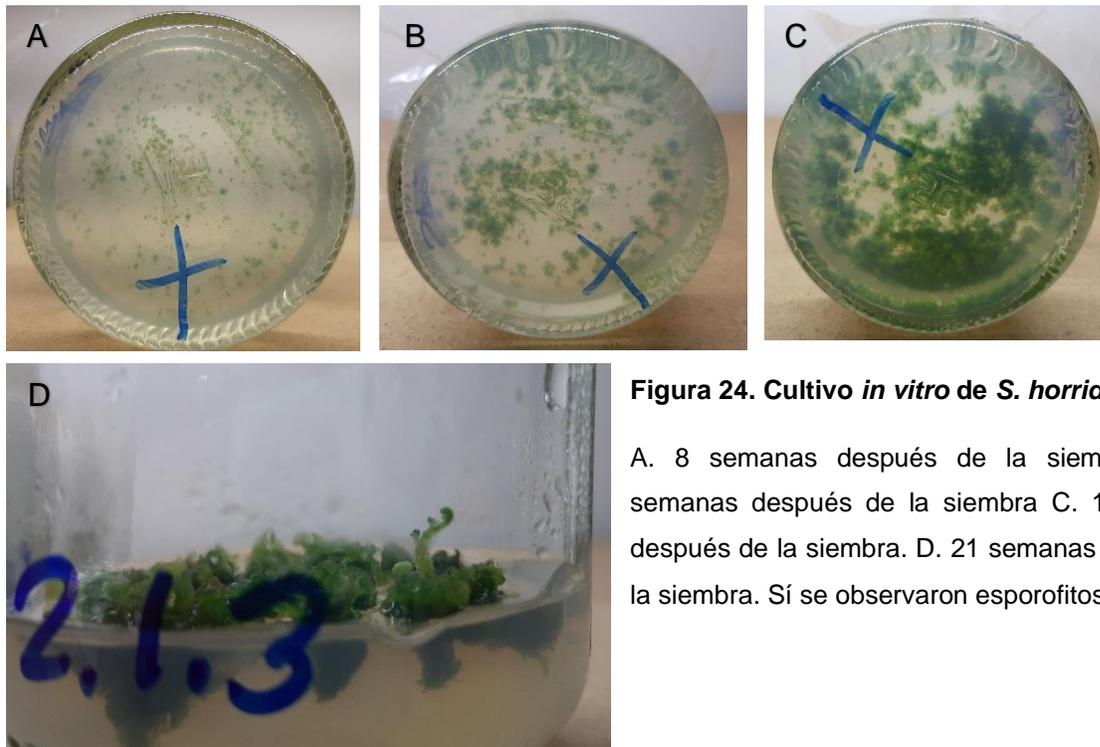
**Figura 20. Fenologías.** Se observan los resultados de las fenologías basadas en las cuatro fases de desarrollo propuestas. Siendo F1 puntos verdes; F2 gametofitos inmaduros; F3 gametofitos maduros y F4 esporofitos. Las especies germinaron y alcanzaron la fase uno en los tres tratamientos, sin embargo sólo en el cultivo en sustrato alcanzaron la fase cuatro todas las especies. La germinación ocurrió mucho antes en el cultivo *in vitro*, aunque no se alcanzó la diferenciación de individuos en todas las especies.





**Figura 23. Cultivo de *S. horrida* Cultivo convencional.**

A. 17 semanas después de la siembra. B. 20 semanas después de la siembra. C. 28 semanas después de la siembra. D. 32 semanas después de la siembra. Sí se observaron esporofitos.



**Figura 24. Cultivo *in vitro* de *S. horrida*.**

A. 8 semanas después de la siembra. B. 10 semanas después de la siembra. C. 11 semanas después de la siembra. D. 21 semanas después de la siembra. Sí se observaron esporofitos.

### 8.16.3 Esporofitos obtenidos

Durante las 40 semanas de evaluación se obtuvieron un total de 3309 helechos diferenciados de las cinco especies y los tres tratamientos evaluados. De estos el 98.25% se obtuvieron con el sustrato y únicamente un 1.75% con el método *in vitro*.

<b>Esporofitos generados</b>			
<b>(individuos)</b>			
<b>Especie</b>	<b>NM</b>	<b>SC</b>	<b>IN</b>
<i>Cyathea divergens</i>	0	0	7
<i>Sphaeropteris horrida</i>	0	1224	46
<i>Adiantum sp.</i>	0	205	4
<i>Nephrolepis exaltata</i>	0	321	0
<i>Asplenium antiquum</i>	0	1502	0
<b>Total</b>	0	3252	57

\*IN= siembra *in vitro*; SC = siembra convencional; NM= siembra nueva metodología.

**Tabla 5. Esporofitos generados.** Se observan el número de individuos diferenciados después de 40 semanas de evaluación. El 98.25% se obtuvieron con el sustrato y únicamente un 1.75% con el método *in vitro*. El mayor número de individuos se obtuvo de *A. antiquum*, seguido de *S. horrida*. Para el método *in vitro* solo se obtuvieron 57 individuos después de 4 subcultivos para cada especie, siendo la mayoría de *S. horrida*.



**Figura 25. Aclimatación de *S. horrida* en el cultivo convencional.** En la semana 36 se hizo la separación de los esporofitos resultantes. En la bandeja se encuentran 77 esporofitos de *S. horrida* para su aclimatación, en su mayoría ya con 2 a 4 frondes ya diferenciados. El sustrato es el mismo que el utilizado para la germinación.

### **8.17 Costos de los métodos y eficiencia**

En relación a los costos de producción de los tres tratamientos aplicados se observa en la Tabla 6 los costos generados durante las 40 semanas de experimentación. La modificación del método Feldhoff y el método convencional incurrieron en gastos iniciales elevados, ya que se compró el material desde cero, incluyendo los sustratos, las cajas contenedoras y herramientas necesarias para realizar la siembra y el cultivo, sin embargo la diferencia entre reemplazar el sustrato de peat-moss por uno sintético fue solo de Q486.87, lo cual es un ahorro únicamente del 13.61%. En cambio para el método *in vitro* el costo inicial de la siembra es bajo en comparación con los otros dos métodos, esto es porque ya se tenían a disposición: el equipo de laboratorio, las herramientas de siembra, las unidades de siembra (frascos) y todo lo necesario para la siembra y el establecimiento. En el anexo 3 están todos los costos ítem por ítem de la producción de los tres métodos.

Como se observa en la Tabla 6 el valor por individuo obtenido es de Q1.10 para el cultivo en sustrato, y de Q95.06 para el cultivo *in vitro*. El costo de una planta cultivada en sustrato representa únicamente el 1.14% de los costos de una planta cultivada *in vitro*. El costo elevado de los esporofitos obtenidos *in vitro* se debe principalmente a la realización de cuatro subcultivos del material obtenido de la germinación original. Es decir que para los subcultivos se incurrió en gastos de más material, más medio de cultivo, mano de obra, y horas de campana de flujo laminar para la siembra. Sin embargo, el cultivo *in vitro* justifica estos gastos por medio de la obtención de más plantas, por ello se puede afirmar que en un quinto subcultivo fácilmente se hubieran cuadruplicado el número de esporofitos obtenidos en el cultivo convencional, reduciendo así el costo por esporofito cultivado en laboratorio. Un quinto subcultivo hubiera a su vez alargado el tiempo de proceso de laboratorio en al menos 6 semanas más.

	Nuevo Método	Cultivo en Sustrato	Cultivo <i>in vitro</i>
<b>Extracción esporas</b>		Q 22.23	
<b>Desinfección esporas</b>		Q 2.36	
<b>Siembra</b>	Q 3,066.20	Q 3,552.90	Q 720.00
<b>Mantenimiento de los cultivos por 40 semanas*</b>	Q 0.17	Q 0.17	Q 4,725.09
<b>Aclimatación</b>	NA	Q 0.17	NA
<b>TOTAL costos de producción</b>	Q 3,090.96	Q 3,577.83	Q 5,469.68
<b>Costo promedio final por planta</b>	NA	Q 1.10	Q 95.96

**Tabla 6. Resumen de los costos de producción.** Se presentan los costos de producción de los esporofitos obtenidos. Los tres métodos comparten el mismo costo promedio de la extracción de las esporas de las cinco especies, así como el costo de la desinfección de las esporas. En cuanto a los costos de siembra el cultivo en sustrato es el más elevado, aunque los costos de mantenimiento son sumamente bajos en comparación con el cultivo *in vitro*. El costo promedio por esporofito obtenido fue de Q1.10 para el cultivo en sustrato y de Q95.96 para los obtenidos en el cultivo en laboratorio.

### **8.18 Proyección para posibles proyectos de conservación**

En base a los costos de producción generados durante 40 semanas de experimentación, se puede deducir que el método convencional de cultivo es el ideal para el cultivo y desarrollo de los helechos trabajados en la presente tesis. El método aunque con porcentajes de germinación menores que en el cultivo *in vitro*, general esporofitos ya adaptados a sustrato, sin la necesidad de sub-cultivar los gametofitos obtenidos, ni manipularlos de ninguna manera. También presenta las ventajas de que las cajas acrílicas son fácilmente apilables, generan bajos costos

de mantenimiento a cambio de una gran cantidad de organismos en pequeños espacios.

La administración de las áreas protegidas podría tener su cultivo de helechos en espacios pequeños, generando organismos a bajos costos para su reinserción en los ecosistemas. Las especies evaluadas provienen de diferentes linajes, por lo que puede decirse que el método de reproducción por esporas podría aplicarse, no sólo a estas especies, sino a muchas otras. Las pruebas serían fácilmente realizables y de bajo mantenimiento, pues una vez sembrados los organismos, el investigador solo deje observar los cambios que se generan una o dos veces por semana. Anotar los cambios y en caso de la diferenciación de los organismos, podrían irse extrayendo de las unidades experimentales a unidades de celdas para su crecimiento individual y control.

## **9 Discusión**

### **9.1 Colecta de esporas**

El primer paso para un cultivo limpio, independientemente de donde o cómo se cultivará, es el elegir buenas plantas madre. En lo posible, plantas ya saneadas y creciendo en ambientes libres de enfermedades. Es recomendable aplicar un tiempo de cuarentena, donde puede o no aplicárseles productos preventivos como fungicidas o antibióticos (Holdgate&Zandvoort, ed.Cassells, 1997). Como se observa en las Figura 4 y 5 en el caso de la colecta de esporas de los helechos arborescentes, lo anterior no se cumple, ya que las plantas estaban de manera natural en parches de bosque, en este caso una parte del Biotopo del Quetzal y de la Finca ORQUIGONIA, ambas representando al corredor del Bosque Nuboso guatemalteco. La selección de las plantas madre también fue proceso completamente aleatorio para las otras tres especies trabajadas, pues se eligieron según su presencia en los transectos recorridos, la madurez de los

individuos encontrados, disponibilidad de esporas e incluso en el caso del nido de pájaro, en base a los únicos especímenes maduros de los que se disponía.

En la tabla 3 se presentan las cantidades de esporas que se extrajeron de cada especie. La producción de esporas de cada especie es un factor intrínseco de la misma (Olsen, 2007). Por ello las cantidades fueron muy variables para todas las especies, incluso dentro de frondes de la misma especie o el mismo organismo. Las especies arborescentes brindaron mayor cantidad de esporas en comparación con las especies ornamentales, esto pudo deberse a que los frondes en sí son más grandes, y que estos tienen esporangios a lo largo de más de 2/3 de la lámina del fronde, en cambio en especies como la cola de quetzal y *Adiantum* los soros se limitan a una región en específico y son más pequeños (Olsen, 2007; T. Ranker & Haufler, 2008).

## **9.2 Desinfección de las esporas**

Una vez secadas, extraídas y almacenadas debidamente las esporas, el paso crucial para un establecimiento exitoso de un cultivo de helechos es el método de desinfección previo a la siembra (Narváez-Parra et al., 2013; Pence, 2015; Reyes et al., 2019) Entre los métodos más comunes para desinfectar cualquier tejido es aplicar cloro comercial, en soluciones que pueden variar desde <1% hasta >35%, dependiendo el tipo de tejido y qué tan resistente sea el mismo. Otro factor variable es el tiempo de exposición a la solución de cloro, que puede ser desde 30 segundos hasta varios minutos (Szendrák, Read & Yang, ed. Cassells, 1997; Silva et al., 2015; Pence, 2015). Así mismo, suelen darse tratamientos con Etanol, usualmente en concentraciones de entre el 70% y el 75%, a tiempo de exposición también variable, desde 30 segundos hasta varios minutos (Narváez-Parra et al., 2013; Pence, 2015; Reyes et al., 2019). La manera más común de reconocer que el método de desinfección ha sido poco exitoso es el crecimiento de colonias bacterianas o de micelio en el medio de

cultivo dentro de las primeras semanas después de la siembra (Leifert & Woodward, ed. Cassells, 1997).

En la primera siembra realizada en el Jardín Botánico CECON-USAC para el método convencional y el método Feldhoff la contaminación que surgió desde los primeros días pudo provenir de las mismas plantas madre (González, 1981). Como se mencionó las plantas madre no fueron tratadas con ningún método preventivo, tampoco las esporas sembradas en este primer intento. En la Figura 14 se observa que la contaminación fue tanto de hongos como por bacterias. En la Tabla 4 se observa también los rangos de las temperaturas alcanzadas en el invernadero. La proliferación de los agentes patógenos pudo verse facilitada por las condiciones de temperaturas favorables y la excesiva humedad dentro de las unidades experimentales (Agríos, 2005; González, 1981)

En cuanto a la siembra en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el protocolo de desinfección de las esporas, por el contrario fue muy agresivo. En este caso la contaminación fue muy baja, con un rendimiento del 86% en la primera semana y sin contaminación luego de las primeras extracciones. Sin embargo la germinación de las esporas pudo verse inhibida por la alta concentración del cloro utilizado (4.76%) ya que como Ruiz (1995) comprobó que el cloro en concentraciones mayores al 10% eran fatales para las esporas de *Cibotium regale*, *Dicksonia gigantea*, *Alsophila salvinii*, *Cyathea divergens var. tuerckheimii* y *Lophosoria quadripinnata*. En este caso concentraciones mayores al 4% constataron ser fatales para las cinco especies evaluadas. En el anexo 4 se observan los protocolos de desinfección de esporas empleados en todos los intentos de siembra. Se puede decir entonces que el protocolo generado de la modificación de Pence, (2015) fue la combinación ideal para los 3 métodos de siembra.

En la segunda fase de siembras el porcentaje de rendimiento de la desinfección como se observa en la Figura 18 fue del 73%. Este rendimiento según los estándares manejados por el laboratorio de Cultivo de Tejidos de Tak

Centroamérica, el rendimiento fue bueno, siendo superior a 70% de manera global, por lo que la validación del método de desinfección de esporas fue exitosa también. Aunque es importante mencionar que cada lote individual un comportamiento distinto. Esto pudo deberse también a la naturaleza del muestro de las plantas madre en ambas colectas (Agríos, 2005; González, 1981).

Otros autores han discutido cómo los tiempos de exposición y las concentraciones de los compuestos utilizados, se han reportado como puntos clave en cuanto al éxito, tanto de la desinfección como de la germinación de las esporas (Pence, 2015; Portillo, 2002; Reyes et al., 2019; Rodas, 2010; Ruiz, 1995). Se sabe que durante los protocolos de desinfección puede perderse una cantidad significativa de las esporas, ya sea porque el protocolo es muy agresivo e inhibe la germinación; o el protocolo, por el contrario es muy débil y los porcentajes de contaminación post siembra inicial son muy altos, por lo que dicho material se pierde (Reyes et al., 2019). Lo que suele hacerse, al momento de identificar algún contaminante en el medio de cultivo, es el descartar el material por completo (Holdgate&Zandvoort, ed.Cassells, 1997) generando gastos en el proceso.

Entre los patógenos que pueden contaminar un medio de cultivo o a las plantas mismas, tenemos a aquellas ya presentes en la planta madre: exopatógenos y endopatógenos, aunque también existen aquellas que son *contaminantes* accidentales, que se dan por algún descuido durante el cultivo, mal manejo de las herramientas, esterilización incorrecta de los materiales, o la misma respiración del micropropagador (Stead, Hennessy&Wilson, ed. Cassells, 1997). En el caso de Narváez-Parra, Jérez-Jaimes, & Mantilla-Serrano, (2013) reportan que la desinfección con Etanol 70% por dos intervalos de 30 segundos cada uno, funcionó de manera adecuada para *Cyathea* aff. *caracasana*. Sin embargo, no reportan un porcentaje global de éxito de la desinfección. En el caso de Reyes et al., (2019) se contrastaron desinfecciones con cloro a 35% a diferentes tiempos de exposición, así como colocando las esporas en viales o en un papel

filtro. Reyes et al. (2019) reportan que la contaminación fue de 100%, al colocar las esporas en un papel filtro, y por ende no hubo germinación; concluyeron que el papel filtro ayuda a que las esporas no se pierdan al momento de añadir el agente desinfectante, pero al parecer no permitió que el mismo entrara en contacto de manera adecuada con las esporas, por lo que determinaron que no era un método eficiente.

Se concluye en esta fase que la combinación utilizada para la desinfección de las esporas fue exitosa. El uso de papel filtro para evitar la pérdida de las esporas, y el uso de Etanol al 70% seguido de hipoclorito de sodio al 4%, por tiempos prudenciales de 15 minutos, junto a la agitación de las esporas dentro del papel filtro para que los compuestos desinfectantes tengan contacto con la superficie de las esporas, es una combinación segura para obtener buenos porcentajes de rendimiento de desinfección de las esporas y que además es segura para la posterior germinación. Para el protocolo de desinfección para la siembra *in vitro* a lo anterior se le añadieron 2 gotas de Tween 20® como un agente tensoactivo no iónico por cada 80ml de solución de cloro.

Los agentes como Tween 20® favorecen los procesos de desinfección de las esporas ya que este tensoactivo se usa como emulsificante de las soluciones con el fin de una mejor solubilidad entre los componentes, sus aplicaciones en ámbitos de laboratorio e industria abarcan diferentes procesos (Granados, 2010; Merk Corporation, 2020), por lo que la solución de cloro, a pesar de estar en baja concentración, puede cumplir su función de desinfectante de mejor manera. Aunque el mecanismo de acción de los hipocloritos no es claro, se sabe que su acción antimicrobiana es de amplio espectro, y que a las concentraciones adecuadas, pueden eliminar a los microorganismos presentes en un tejido y/o una superficie en tiempos de exposición variables, aunque en algunas ocasiones las endosporas de algunas bacterias entran únicamente en latencia por un tiempo indefinido, pudiendo generar colonias más adelante (Rutala & Weber, 1997). La contaminación bacteriana puede ser introducida por el mismo explante

utilizado o por el mal manejo de alguna herramienta o mala praxis de los protocolos de prevención de contaminación dentro del laboratorio (Cassells, 1997). Así mismo la contaminación bacteriana suele manifestarse después que la fúngica, pudiendo variar incluso varias semanas (Pype, Everaert & Debergh, ed. Cassells, 1997; Cassells, 1997).

### 9.3 **Siembra**

Luego de la desinfección de esporas el proceso de la siembra es clave. Las siembras pueden ser por aspersion de las esporas con micropipetas, jeringas o instrumentos similares (Wu et al., 2010). La siembra por aspersion demostró ser exitosa tanto en la siembra convencional, como en la siembra del método Feldhoff en las dos ocasiones de siembra. Ya que las esporas tienen una capa inicialmente impermeable, su manejo por aspersion es sencillo.

En cuanto a la siembra *in vitro* se realizó por medio del contacto directo del papel filtro donde fueron desinfectadas las esporas en el medio de cultivo. A diferencia de lo ocurrido a Reyes et al., (2019) en este caso sí se obtuvo un buen porcentaje de rendimiento de desinfección de las esporas, a pesar del uso de papel filtro sin esterilizar.

Algunas maneras de disminuir la contaminación durante la siembra *in vitro*, después de las esporas han sido desinfectadas son: el uso correcto del mechero para flamear los instrumentos, las aplicaciones de Etanol al 70% en las superficies de contacto, y el equipo de protección personal (Cruz, 2012; Fernández et al., 2013; McKendrick, 2000). Se reporta que el uso de etanol 70% atomizado al momento del proceso de cultivo, ayuda a mejorar el rendimiento de los procesos de desinfección en la campana de flujo laminar, pues la superficie de los contenedores se mantienen libres de contaminantes (Narváez-Parra et al., 2013). Sin embargo, algunos autores mencionan que pueden añadirse al mismo medio de cultivo antibióticos y/o antifúngicos específicos, sin embargo,

esto se recomienda con cultivos cuyos patógenos ya han sido claramente caracterizados. Así mismo los patógenos podrían generar resistencia a los compuestos utilizados, por ello su uso en cultivo de tejidos debe ser regulado (Falkiner, ed. Cassells, 1997). Y en helechos, algunos compuestos parecen inhibir la germinación (Reyes et al., 2019). La mejor manera de mantener un cultivo sano, es el correcto manejo del equipo, controles estrictos de desinfección, esterilización y respetando las áreas de trabajo (Pype, Everaert & Debergh, ed. Cassells, 1997).

#### **9.4 Fenología y éxito en la germinación**

Para Reyes et al.,(2019) la germinación de esporas *in vitro* ha sido clave en la determinación de las características de los gametofitos, así como el establecimiento en las fenologías. En este caso, como se observa en las Figuras 19, 2, 22 y 24, así como la Tabla 5, se obtuvo éxito en la germinación y la determinación de las fenologías para estos helechos.

Aunque en el método Feldhoff no se obtuvo el desarrollo de los organismos después de la germinación, en los cultivos convencional e *in vitro* sí. Se ha evidenciado que los medios de cultivos bajos en nutrientes y/o azúcares, junto con un buen manejo espacial del cultivo, son óptimas para la propagación de *Cyathea aff. Caracasana* (Narváez-Parra et al., 2013) y *Cyathea robertsiana* (Goller & Rybczyński, 2007). Para otros helechos parece ocurrir lo mismo, aunque con medio de cultivo diferentes, que varían entre sí en las proporciones de los nutrientes y/o la fuente de carbohidratos: *Adiantum reniforme*, que presentó un mejor desarrollo con  $\frac{1}{4}$  de los nutrientes M&S y 15g/L de azúcar, aunque mencionan que para fases posteriores lo mejor es un medio completo, pues los esporofitos parecen tener mayores requerimientos nutricionales (Wu et al., 2010). Esto puede explicar la muerte de los gametofitos con el método Feldhoff, ya que la tela utilizada como medio sintético de cultivo carecía

nutrientes de cualquier tipo. Así mismo puede explicar el éxito de la propagación en peat-moss ya que la perlita y la vermiculita proporcionan aireación y micronutrientes esenciales para las plantas, que combinadas con la humedad del sustrato y la aplicación de Bayfolan® Bayer© cuando empezaron a generarse los esporofitos, suplió la necesidad nutricional de las plantas.

Para *Platycerium bifurcatum*, se demostró que el mejor medio de cultivo para los gametofitos *in vitro* fue un M&S50 sin azúcar, durante la fase gametofítica, y añadiendo azúcar para el cambio a los esporofitos (García et al., 2013); Granados, (2010) realizó pruebas con 9 tipos de medio de cultivo diferentes, siendo modificaciones de un medio M&S100 ya sea en los porcentajes de nutrientes y/o azúcares, dando como resultado que un tratamiento de 0% de azúcar con 50% de nutrientes, y un 100% sacarosa, con 50% nutrientes (con respecto a un M&S100) eran los medios ideales para el desarrollo de sus gametofitos, aunque no necesariamente para la germinación.

#### 9.4.1 *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii*

Ha habido intentos en diferentes ocasiones para la reproducción *in vitro* del género *Cyathea* (Narváez-Parra et al., 2013; Ospina et al., 2015; Randi & Hiendlmeyer, 2007; Rechenmacher et al., 2010; Shukla & Khare, 2012). El género parece responder bien a diferentes métodos de cultivo.

Randi & Hiendlmeyer, (2007) llegaron a la conclusión para *Cyathea delgadii* que los helechos necesitan condiciones apropiadas de luz y humedad para poder desarrollarse bien. En su caso comprobaron que la luz directa mayor del 40% puede llegar a ser fatal para los gametofitos jóvenes, sin embargo la disponibilidad de nutrientes del medio de Dyer pareció ser clave para el desarrollo de las fases tempranas. Esto coincide con los reportes para la germinación de *Cyathea australis* y *Cyathea spinulosa*, donde se indica que concentraciones bajas de macro y micronutrientes parecen ser necesarios para

una germinación exitosa y en menor tiempo que aquellos cultivos con exceso de nutrientes o sin nutrientes alguno (Shukla & Khare, 2012). Como se observa en las figuras 19, 20 y 21, *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* no respondió bien al método Feldhoff, ni al método convencional, presentando bajos porcentajes de germinación y desarrollo. Esto pudo deberse a la baja concentración de nutrientes, siendo nulo en el sustrato sintético y demasiado bajo en el sustrato de peat-moss. En cambio en el cultivo *in vitro* se obtuvo buen porcentaje de germinación, como se observa en las figuras 19 y 22, aunque no se llegó a la fase esporofítica, esto puede sugerir que el ciclo de vida de este helecho requiere de más tiempo para madurar y desarrollarse en comparación con *S. horrida*.

Se ha determinado que, al igual que para otros cultivos, el pH y su papel en la disponibilidad de nutrientes es clave para la germinación y posterior establecimiento de los helechos. Un pH ligeramente ácido, entre 5.6 y 5.8 parece ser el más indicado para la germinación de los helechos en general, y clave para la germinación de *C. bicrenata* (Reyes et al., 2019) lo que mismo que para *C. aff. caracasana* (Narváez-Parra et al., 2013). El pH de la tela era de 6.6 debido al agua utilizada para humedecer la tela, mientras que el pH del peat-moss era garantizado por el proveedor como 5.9. El pH del medio de cultivo M&S fue de 5.8, esto puede explicar la baja tasa de germinación en el sustrato, y el mejor rendimiento de la germinación en el laboratorio.

#### 9.4.2 *Sphaeropteris horrida*

Los intentos de cultivo para *S. horrida* se han concentrado más en cultivos convencionales (Bernabe et al., 1999; Briones & Riaño, 2014; Olsen, 2007). *S. horrida* ha demostrado ser una especie de crecimiento más rápido en comparación con otros helechos arborescentes, así mismo lo distingue su particular tolerancia a cambios de temperatura más bruscos, exposición directa al sol por más tiempo y cambios de humedad (Briones & Riaño, 2014; Olsen,

2007). Esta plasticidad les confiere una mayor supervivencia ante los cambios del bosque nublado de donde son originarios (Briones & Riaño, 2014).

Como se observa en las Figuras 19, 20, 23, 24 y 25 *S. horrida* presentó tolerancia a las diferentes condiciones de los tres tratamientos, diferentes niveles de pH y disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Tuvo un buen rendimiento en el sustrato y la diferenciación de los individuos a partir de un 4to subcultivo *in vitro* sugiere que en un subcultivo más se hubiera obtenido fácilmente hasta cuatro veces más esporofitos que en el cultivo convencional. La germinación de esporas para *S. horrida* se ha reportado en las primeras 6 semanas (Bernabe et al., 1999). En el cultivo *in vitro* sí se cumplió ese plazo tiempo reportado por Bernabe y colaboradores (1999), aunque para el sustrato convencional y el sintético la germinación ocurrió hasta la semana 11. Esto sugiere que al igual que con *C. divergens* var. *tuerckheimii* la disponibilidad de nutrientes pudo afectar estos rendimientos de germinación para los otros métodos evaluados, hecho que se corrigió con las aplicaciones realizadas de Bayfolan durante el experimento. Una vez con nutrientes a disposición, los esporofitos de *S. horrida* se desarrollaron exitosamente en el sustrato, siendo el helecho con mejor tasa de diferenciación en los tratamientos evaluados. Tal como se observa en la tabla 5 y en la figura 25, el número de individuos exitosamente obtenidos fue muy alta.

## 9.5 Costos de producción

La responsabilidad de todo micropropagador y las empresas a las que pertenecen es la de mantener los estándares de calidad, locales y/o internacionales, junto a precios beneficiosos, para que sus cultivos puedan ser competitivos en el mercado (Cassells, 1997). Para ello el manejo correcto del equipo, el mantenimiento de este, las capacitaciones del personal y los estándares del cultivo, ya sea convencional o en laboratorio, deben ser estrictos.

También se reconoce que la micropropagación y la tecnología para el cultivo de tejidos puede traer beneficios económicos significativos cuando se las compara con los métodos convencionales en cuanto a costos de producción y número de plantas obtenidas vs tiempo de cultivo (Read & Chishimba, ed. Cassells, 1997).

La contaminación microbiana es una de las causas principales de pérdidas en cultivos (Agríos, 2005; González, 1981). En los laboratorios de cultivos de tejidos vegetales la toma de datos inadecuada sobre las pérdidas además pueden generar protocolos poco viables en proyectos a escala industrial/comercial (Leifert & Woodward, ed. Cassells, 1997). Un 2% de pérdidas en los subcultivos de cualquier índole es un porcentaje aceptable, siendo el máximo aceptado de un 5% (Leifert & Woodward, ed. Cassells, 1997). En este caso las pérdidas de un 40% de las siembras *in vitro* (reflejado en el éxito de la desinfección de un 73% global para los tres tratamientos en la Figura 18), representa un gasto de Q26.32 por frasco en promedio (Anexo 4), lo que deriva en un total de Q526.40 que se perdieron en el proceso de siembra inicial. Esto podría representar un gasto menor para un laboratorio bien establecido, sin embargo, para la producción *in vitro* a gran escala, la pérdida inicial de 40% de las siembras de esporas, es un costo muy alto. Uno de los problemas con los que la micropropagación presenta mayores inconvenientes es la contaminación en cualquiera de sus niveles, lo cual repercute en las proyecciones económicas de una producción exitosa (Cassells, 1997).

El volumen de producción y los costos de la misma son claves en cuanto al establecimiento de un costo por planta, mientras que los clientes buscan calidad, plantas sanas y con las características deseadas (Holdgate&Zandvoort, ed. Cassells, 1997). Así, con los frascos restantes de las siembras iniciales, puede *compensarse* el gasto generado por las pérdidas iniciales, pues la separación que surge en las fases posteriores y el potencial de plantas obtenidas a costos bajos, pues de un solo frasco pueden separarse hasta un máximo de 15 frascos, mismos que al tupirse darán origen hasta otros 10 frascos cada uno,

y así sucesivamente hasta obtener plantas diferenciadas (datos experimentales personales obtenidos durante la fase de subcultivos). Al parecer el manejo espacial es clave en el desarrollo de los gametofitos (Portillo, 2002; Ruiz, 1995), pudiendo manejar así mismo los costos derivados de producción con el control espacial para que las plantas se desarrollen de manera adecuada ya que los costos de producción suelen representar cerca del 60% en cuanto a la micropropagación. Estos gastos incluyen los químicos y la energía invertida por el equipo de laboratorio (Holdgate&Zandvoort, ed.Cassells, 1997).

Sin embargo la tecnología conlleva la inversión de equipo especializado, suministros de químicos, productos hormonales o capacitaciones de los empleados, que en algunos países en desarrollo están muy lejos de ser accesibles a todo público (Read & Chishimba, ed. Cassells, 1997). Algunas alternativas son la adaptación de equipos para más de una función, probar materiales locales para evitar la importación y sus costos, probar materiales alternativos o el reciclaje de estos, adquisición de equipo o material de segunda mano, pueden ser algunas de las alternativas que ayudan a que el montaje de un laboratorio desde cero sea más accesible. Muchos laboratorios funcionan a partir de la adaptación de edificios o establecimientos que antes funcionaban para otros propósitos, y que con algunos cambios o reestructuraciones, se evitaban el construir una infraestructura desde cero (Read & Chishimba, ed. Cassells, 1997). Así los costos de producción generados en esta investigación podrían reducirse aún más, si se encuentra un medio de cultivo aún más barato para la propagación, o bien disminuyendo el costo del agar, ya que es el compuesto más caro del medio de cultivo utilizado en la presente investigación. Algunas alternativas para disminuir el costo del agar pueden ser: cambiar de distribuidor, marca o presentación, pues algunos distribuidores venden a mejor precio si se compran más de 2kg de agar por vez; así mismo se puede utilizar algún sustituto del agar, como *Gellan gum*®, *Phytigel*® o Agar de grado industrial y no de grado de laboratorio (Martin et al., 2012), esto último es similar

a lo que ocurre con el uso de azúcar convencional como sustituto directo de sacarosa de grado de laboratorio.

Sin embargo, para los fines de conservación de esta investigación, el costo de una planta producida *in vitro* no podrá competir con el costo de una planta producida en sustrato. Como se observa en la Tabla 6, el método de sustrato fue el más eficiente, ya que en las 40 semanas de experimentación, se obtuvieron más de 3,000 esporofitos de las 5 especies trabajadas, en comparación con 57 obtenidos en laboratorio en el mismo tiempo (Tabla 5). Los programas de conservación pueden no tener los recursos para producir *in vitro* cantidades significativas de plantas para su reinserción en el ecosistema. Esto requeriría convenios entre las organizaciones involucradas o precios especiales para los programas de conservación, sin embargo puede que ese escenario no sea el más realista.

Se concluye que los gastos generados durante el cultivo en sustrato obtuvieron un beneficio que los compensó. Los porcentajes de germinación fueron buenos, el protocolo de desinfección fue validado, y se obtuvo un primer acercamiento a las especies deseadas. Así mismo las unidades de germinación, y otros materiales utilizados para la siembra en sustrato serían una inversión inicial, pues pueden ser reutilizados indefinidamente mientras se les dé un manejo adecuado.

## 10 Conclusiones

1. El uso de Etanol al 70% seguido de hipoclorito de sodio al 4% con 2 gotas de Tween 20® por lote de desinfección de 0.12g de esporas, por 15 minutos cada uno, junto a la agitación de las esporas dentro del papel filtro es una combinación segura para obtener buenos porcentajes de rendimiento de desinfección de las esporas para estas especies siendo superior al 70% esperado en los tres métodos evaluados.
2. La germinación puede obtenerse en condiciones adecuadas de humedad y temperatura. La germinación fue posible en condiciones sólo de humedad con el método propuesto del sustrato a base de algodón. Sin embargo para las fases posteriores se requiere de nutrientes y un pH adecuado para que los gametofitos sobrevivan, maduren y se diferencien.
3. El costo de producción de una planta en sustrato representa el 1.14% del costos de una planta producida *in vitro*.
4. El método más eficiente para la reproducción de los helechos evaluados fue el método de cultivo en sustrato generando más de 3,000 organismos de 4 de las 5 especies evaluadas en un plazo de 40 semanas.

## 11 Recomendaciones

1. El generar las fenologías completas de las especies para el proceso *in vitro*, ya que los tiempos de germinación y desarrollo de los gametofitos demostró ser más rápido que en los otros métodos evaluados, aunque el desarrollo de los esporofitos no se dio dentro de las primeras 40 semanas.
2. Emplear otros medios de cultivo y/o agentes gelatinizantes que puedan bajar los costos de la producción *in vitro* para determinar procesos más eficientes económicamente.

3. Evaluar un proceso mixto, en el cual la germinación y primeras fases gametofíticas se desarrollen *in vitro* y que la diferenciación se haga en sustrato. Esto combinaría el alto porcentaje de germinación junto a desarrollo más rápido de los gametofitos, con los costos reducidos de un proceso en sustrato que además endurecería a los cultivos al mismo tiempo, acortando costos y tiempos de la fase de aclimatación.

## 12 Referencias

- Aasim, M., Karataş, M., Khawar, K., & Doğan, M. (2013). Optimization of Sterilization and Micropropagation of Water Lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *Journal of Applied Biological Sciences*, 7(3), 71–74.
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología* (2da ed.). México: Limusa.
- Archila, E. (2014). *Manual de Soluciones Madre para medio M&S sin hormonas*. Guatemala: Manual interno de la compañía BOKREA, S.A.
- Archila, Y. (2015). *Sistematización del Modelo de Restauración Ecológica del Centro de Conservación ORQUIGONIA, Cobán, Alta Verapaz*. Universidad Rafael Landívar.
- Arditti, J. (2008). *Micropropagation of Orchids: Volume 1* (2nd ed.). Malden, USA: Blackwell Publishers.
- Ávila, R., Pérez, M., Cajas, J., & Morales, J. (2006). *Análisis de la Lluvia de Polen y su Relación con la Vegetación Actual: Estudio Preliminar para la Reconstrucción del Paisaje Local en la Reserva de Bosque Nuboso Chelemha, Alta Verapaz, Guatemala - Proyecto FODECYT No. 52-2004*. Guatemala.
- Azcon-bieto, J., & Talón, M. (n.d.). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana.
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill (2da ed.). Barcelona: McGraw-Hill Interamericana.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Barros, A., Salinero, C., Vela, P., & Sainz, M. (2008). Método rápido para la propagación de helechos ornamentales. *Actas de Horticultura*, 52, 350–354.  
 Retrieved from [http://www.areeiro.es/comun/publicaciones/Comunicaciones/2008/Barros\\_hel echos\\_propagacion\\_350.pdf](http://www.areeiro.es/comun/publicaciones/Comunicaciones/2008/Barros_hel echos_propagacion_350.pdf)

- Bernabe, N., Williams-Linera, G., & Palacios-Rios, M. (1999). Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud forest remnant: Spore germination and sporophyte survival and establishment. *Biotropica*, 31(1), 83–88. <https://doi.org/10.2307/2663961>
- Briones, O., & Riaño, K. (2014). Ecofisiología de helechos del bosque nublado. In *Botánica na América Latina* (pp. 212–222). Veracruz, México: Instituto de Ecología. <https://doi.org/10.13140/2.1.1835.8723>
- Brown, A. (2001). *Microbiological Applications*. Benson. New York: McGraw-Hill Companies. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_2)
- Brownsey, P. J. (2001). New Zealand's pteridophyte flora - Plants of ancient lineage but recent arrival? *Brittonia*, 53(2), 284–303. <https://doi.org/10.1007/BF02812703>
- Brujinzeel, L. A., Kappelle, M., Mulligan, M., & Scatena, F. N. (2011). Tropical montane cloud forests: State of knowledge and sustainability perspectives in a changing world. In L. A. Brujinzeel, F. N. Scatena, & L. S. Hamilton (Eds.), *Tropical Montane Cloud Forests: Science for Conservation and Management* (pp. 691–740). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511778384.074>
- Cabarrús, A. (2019). Entrevista con Francisco Archila.
- Cabarrús, Andrea. (2017). Entrevista con Uwe Feldhoff. Guatemala.
- Campbell, N., & Reece, J. (2007). *BIOLOGÍA* (7ma ed.). Madrid: Médica Panamericana.
- Cañal, M., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 1, 3–9.
- Cappuccino, J., & Sherman, N. (2014). *Microbiology: A laboratory manual* (10th ed.). New York: Pearson Education, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.01.008>

- Cassells, A. (Ed.). (1997). *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Cork, Ireland: Springer Science. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-8951-2>
- Chaverri-Polini, A. (1998). Mountains , biodiversity and conservation. *Unasylvia*, 49(195), 1–6. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/w9300e/w9300e09.htm#mountains>, biodiversity and conservation
- Christenhusz, M. J. M., & Chase, M. W. (2014). Trends and concepts in fern classification. *Annals Of Botany*, 113, 571–594. <https://doi.org/10.1093/aob/mct299>
- CONAP. (2009). Lista de Especies Amenazadas de Guatemala -LEA-, 122.
- Cruz, F. (2012). *Manual de Prácticas: Cultivo de tejidos vegetales*. México: Universidad Autónoma de México.
- de Vargas, I. B., & Droste, A. (2014). In vitro propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): Spore storage and sterilization conditions. *Revista de Biología Tropical*, 62(1), 299–308. <https://doi.org/10.15517/rbt.v62i1.3661>
- Del, B., Polytrichum, M., Morantes, J., Prieto, C., & Linares, E. (n.d.). ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y DE ACTIVIDAD.
- Dyer, A. (1979). The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In *Experimental Biology of Ferns* (pp. 253–305). London: Academic Press.
- Eleuterio, A. (2006). Notes on Economic Botany. *Economic Botany*, 60(2), 182–191. <https://doi.org/10.2307/2807134>
- Eleutério, A. A., & Pérez-Salicrup, D. (2009). Transplanting Tree Ferns to Promote Their Conservation in Mexico. *American Fern Journal*, 99(4), 279–291. <https://doi.org/10.2307/25639841>
- Escámez, A. (1989). Los Heléchos : elementos esenciales en la conservación de

nuestra flora. *Revista Del Centro Asociado a La UNED*, 13, 79–118.

Escaso, F., Martínez, J., & Planello, M. del R. (2010). *Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal* (1era ed.). Madrid: Pearson Educación, S.A. Retrieved from <https://www.biblionline.pearson.com/Pages/BookDetail.aspx?b=661>

Farfán-Santillán, N., Mendoza-Ruiz, A., Pérez-García, B., & Velázquez-Montes, E. (2017). Desarrollo de los gametofitos de especies Mexicanas de helechos de la familia Gleicheniaceae. *Revista de Biología Tropical*, 65(3), 939–952. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i3.26346>

Farrar, D. R. (1998). The Tropical Flora of Rockhouse Cliff Formations in the Eastern United States. *Journal of the Torrey Botanical Society*, 125(2), 91–108. <https://doi.org/10.2307/2997297>

Fernández, E., Casares, A., & Ordás, R. (2013). *Prácticas de biotecnología vegetal*. Oviedo, España: Universidad de Oviedo. Retrieved from [http://ocw.uniovi.es/pluginfile.php/2621/mod\\_resource/content/1/practicas/Cuaderno\\_Pract\\_Biotec\\_11\\_OCW.pdf](http://ocw.uniovi.es/pluginfile.php/2621/mod_resource/content/1/practicas/Cuaderno_Pract_Biotec_11_OCW.pdf)

Gabriel y Galán, J., Prada, C., & Rolleri, C. (2008). Germinación de la espora, morfología del gametofito y expresión sexual de *Polypodium feuillei* Bertero. (Polypodiaceae). *Gayana*, 65(1), 14–22.

García, L., Torres, D., & Romero, C. (2013). Regeneración de esporofitos de *Platyterium bifurcatum* (Cav.) C.Ch. a partir de esporas germinadas in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 13(2), 99–105.

Goller, K., & Rybczyński, J. (2007). Gametophyte and Sporophyte of tree ferns in vitro culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(3), 193–199.

González-Rosas, H., Herrera-Meléndez, J., & Ramos-Villaseñor, A. (2006). Multiplicación in vitro de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott, a partir de esporas. *Revista Chapingo, Serie de Horticultura*, 12(1), 141–146.

- González, L. C. (1981). *Introducción a la Fitopatología*. (J. Escoto, Ed.). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Granados, M. (2010). *Germinación de esporas y gametofitos de helechos de paramo bajo condiciones ex situ*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Greer, G., Lloyd, R., & McCarthy, B. (1997). Factors Influencing the Distribution of Pteridophytes in a Southeastern Ohio Hardwood Forest. *Torrey Botanical Society*, 124(1), 11–21.
- Grime, J. P. (1985). Factors limiting the contribution of pteridophytes to a local flora. *Comparative Plant Ecology*, 86B, 403–421. <https://doi.org/doi:10.1017/S0269727000008393>
- Hoshizaki, B., & Moran, R. (2001). *Fern Grower's Manual* (1st extend). Oregon: Timber Press, Inc.
- Isasi, E. (2011). Los conceptos de especies indicadoras, paraguas, banderas y claves: su uso y abuso en la ecología de la conservación. *Interciencia*, 36(1), 31–38.
- Jahan, M. T., Islam, M. R., Khan, R., Mamun, A. N. K., Ahmed, G., & Hakim, L. (2009). In vitro clonal propagation of Anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) using callus culture. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 19(1), 61–69. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v19i1.4961>
- Jain, S. M., & Häggman, H. (2007). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Netherlands: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7>
- Janssens, J., & Sepelie, M. (1989). In vitro multiplication of *Blechnum* spp. and *Pelaea rotundifolia* (Forst.) Hook by homogenization. *Scientia Horticulturae*, 38, 161–164. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(89\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(89)90028-9)
- Jiménez, J. (2009a). *Diversidad de Helechos (Monilophyta) en las áreas protegidas del Corredor del Bosque nubosos, en Purulhá, Baja Verapaz*. Universidad San

Carlos de Guatemala.

Jiménez, J. (2009b). *Los helechos del Corredor del Bosque Nuboso de Baja Verapaz, Guatemala* (1era ed.). Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad - INBio.

Jiménez, J. (2012a). *Identificación y Evaluación de Especies de Helechos (Monilophyta) Amenazadas de Extinción a Nivel Nacional y Propuestas para su Conservación - Proyecto FODECYT No. 07-2011*. Guatemala.

Jiménez, J. (2012b). Los Helechos (Monilophyta: psilotopsida, equisetopsida, marattiopsida y polypodiopsida) de Guatemala. In E. Cano & J. Schuster (Eds.), *Biodiversidad de Guatemala II* (1era ed., pp. 9–16). Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala.

Juárez-Orozco, S., Orozco-Segovia, A., Mendoza-Ruiz, A., & Pérez-García, B. (2013). Spore germination of eight homosporous ferns in a temperature gradient. *South African Journal of Botany*, 87, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.04.005>

Judd, W., Campbell, C., Kellog, E., Stevens, P., & Donoghue, M. (2016). *Plant Systematics: A phylogenetic approach* (4th ed.). USA: Sinauer Associates, INC.

Ko, W.-H. (2003). Germination of Fern Spores in Natural Soils. *American Fern Journal*, 93(2), 70–75. [https://doi.org/10.1640/0002-8444\(2003\)093\[0070:gofsin\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1640/0002-8444(2003)093[0070:gofsin]2.0.co;2)

Korall, P., Conant, D., Metzgar, J., Schneider, H., & Pryer, K. (2007). A molecular phylogeny of scaly tree ferns (Cyatheaceae). *American Journal of Botany*, 94(5), 873–886. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.5.873>

Kyte, L., & Kleyn, J. (1987). *Plants from test tubes: An Introduction to Micropropagation*. Timber Press, Inc. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19880390357>

- López-Romero, J., Riaño, K., & Briones, O. (2016). Germinación y frecuencia de esporofitos de dos especies simpátricas de *Blechnum* (Blechnaceae). *Acta Botanica Mexicana*, (117), 47–58. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1167>
- MARN. (2011). Plan estratégico para el manejo sostenible de la subcuenca del Río Cahabón. Guatemala: Magna Terra Editores.
- Martin, D., Cárdenas, O., & Pacheco, J. (2012). Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 49–62.
- McKendrick, S. (2000). *Manual Para La Germinación in vitro De Orquídeas*. Ceiba Foundation for Tropical Conservation.
- Mehlreter, K. (2008). Phenology and habitat specificity of tropical ferns. In T. H. Ranker & Christopher (Eds.), *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes* (pp. 201–221). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541827.009>
- Mehlreter, K., Walker, L., & Sharpe, J. (2010). *Fern Ecology*. NY: Cambridge University Press.
- Mendoza-Ruiz, A., & Pérez-García, B. (2009). Morphogenesis of the gametophytes of eight Mexican species of *Blechnum* (Blechnaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 88, 59–72. <https://doi.org/10.21829/abm88.2009.313>
- Merk Corporation. (2020). TWEEN® 20 Security Information. Retrieved August 7, 2020, from <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p1379?lang=en&region=GT>
- Morales, I. (2011). *Manual para el Cultivo In Vitro de la Orquídea Cattleya nobilior “Flor símbolo de Concepción”* (1st ed.). Bolivia: Editorial El País. Retrieved from <https://www.festivaldelaorquidea.com/docs/ManualOrquideas2011.pdf>
- Muñiz Díaz De León, M. E., Mendoza-Ruiz, A., & Pérez-García, B. (2005). Usos De

- Los Helechos Y Plantas Afines. *Etnobiología*, 5(2005), 117–125.  
<https://doi.org/10.1177/002383099503800102>
- Murillo-Gómez, P. A., Naranjo, E., Callejas, R., Atehortúa, L., & Urrea, A. (2014). Micropropagación de la especie nativa *Anthurium antioquiense* Engl. para su conservación. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 334–340.  
<https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v32n3.46809>
- Myers, C. (1969). The ecological geography of cloud forest in Panama. *American Museum Novitates*, 2396(2396).
- Narváez-Parra, E., Jérez-Jaimes, J., & Mantilla-Serrano, J. (2013). Etapas de Desarrollo in vitro del Gametofito del Helecho Arborescente *Cyathea aff caracasana* (Klotzsch) Domin. *Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 11(2), 74–84.
- Noss, R. F. (1990). Indicators for Monitoring Biodiversity : A Hierarchical Approach. *Conservation Biology*, 4(4), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.1990.tb00309.x>
- Olsen, S. (2007). *Encyclopedia of Garden Ferns* (1st ed.). London: Timber Press, Inc.
- Ospina, K. R., Briones, O., & Pérez-García, B. (2015). Spore Germination of Three Tree Fern Species in Response to Light, Water Potential, and Canopy Openness. *American Fern Journal*, 105(2), 59–72. <https://doi.org/10.1640/amfj-105-02-59-72.1>
- Page, C. (2002). Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 119, 1–33.  
[https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(01\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(01)00127-0)
- Page, C. N. (2002). Ecological strategies in fern evolution: A neopteridological overview. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 119(1–2), 1–33.  
[https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(01\)00127-0](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(01)00127-0)

- Pawlowski, W. P., Grelon, M., & Armstrong, S. (2013). *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. (M. Lambardi, E. Ozudogru, & S. M. Jain, Eds.). New York: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8>
- Pence, V. C. (2015). Propagation and cryopreservation of *Asplenium scolopendrium* var. *americanum*, the American hart's-tongue fern. *American Fern Journal*, *105*(3), 211–225. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-105.3.211>
- Pepper, I., & Gerba, C. (2004). *Environmental microbiology* (2nd ed.). London: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1515/psr-2016-0118>
- Pérez-García, B., & Reyes-Jaramillo, I. (1993). Helechos: Propagación y Conservación. *Revista CIENCIAS*, *30*, 11–17.
- Portillo, L. (2002). *Evaluación de cinco medios de cultivo para la reproducción in vitro del helecho Chipe Cnemidaria mutica C. Presl*. Universidad Rafael Landívar.
- Ramirez-Valencia, V., Sanin, D., & Alvarez-Mejia, L. M. (2009). Estimación del Crecimiento de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae Hook.) en la Reserva Forestal Protectora de Río Blanco, Manizales, Caldas y Registros Colombianos de su Fertilidad. *Boletín Científico Del Museo de Historia Natural*, *13*(1), 17–29.
- Ramírez, M. del R., Pérez-García, B., & Riba, R. (2000). El suelo... un banco natural de esporas y helechos. *Contacto S*, *36*, 15–18.
- Ramos, J. P., Giudice, G., Pipo, L., & Luján, M. (2014). Morfología de las Esporas, Desarrollo Gametofítico y Conservación de *Thelypteris abbiattii*, *T. hispidula* (Thelypteridaceae) de la reserva natural Punta Lara, Buenos Aires. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, *49*(2), 217–226.
- Randi, A. M., & Hiendlmeyer, R. (2007). Response of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum*

- brasiliense Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta Botanica Brasilica*, 21(4), 909–914.
- Ranker, T., & Haufler, C. (2008). *Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes* (1st ed.). New: Cambridge University Press.
- Ranyaphi, R. A., Mao, A. A., & Borthakur, S. K. (2012). In vitro plant regeneration of wintergreen (*Gaultheria fragrantissima* Wall.): Assessment of multiple nutrient formulations and cytokinin types. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(2), 197–204.
- Rashid, A. (1972). In vitro sporogenesis in a fern. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 66, 277–279. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(72\)80084-9](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(72)80084-9)
- Raven, P., Evert, R., & Eichhorn, S. (1986). *Biology of Plants* (4th ed.). New York: Worth Publishers, INC.
- Rechenmacher, C., Schmitt, J., & Droste, A. (2010). Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) under different pH conditions. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4 (suppl.)), 1155–1160. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000600004>
- Reyes, S., González, H., Castillo, A., Volke, V., Jacinto, C., Carvajal, C., & García, G. (2019). Importancia del pH y protocolo de desinfección en la germinación de esporas de *Cyathea bicrenata*. *BioTecnología*, 23(1), 22–31.
- Rice, R., Alderson, P., Hall, J., & Ranchhod, A. (1992). Micropropagation: Principles and Commercial Practice. In *Regeneration and Propagation Systems* (1st ed., pp. 129–149). United Kingdom: Pergamon Press plc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-034731-8.50015-1>
- Rodas, G. (2010). *Evaluación de la Micropropagación de Calahuala *Phebidium decumanum* (Willd.) J.Sm en cuatro concentraciones de medio MS utilizando soros y de la propagación en tres sustratos usando esporas*. Universidad San Carlos de Guatemala.

- Ruiz, J. (1995). *Reproducción y Propagación de Algunas Especies de Helechos Arborescentes*. Universidad del Valle de Guatemala.
- Rünk, K., & Zobel, M. (2009). Differences In Post-Emergence Growth Of Three Fern Species Could Help Explain Their Varying Local Abundance. *American Fern Journal*, 99(4), 307–322. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-99.4.307>
- Rutala, W. A., & Weber, D. J. (1997). Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 597–610. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.597>
- Schneider, H. (2012). Evolutionary Morphology of Ferns (Monilophytes). *The Evolution of Plant Form*, 45, 115–140. <https://doi.org/10.1002/9781118305881.ch4>
- Seguí, J. M. (2010). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas* (1era ed.). Valencia: Universidad de Valencia. <https://doi.org/10.0-8400-5444-0>
- Seral, A., Flores-Bavestrello, A., & Gabriel y Galán, J. M. (2016). Desarrollo y reproducción de los gametófitos de dos especies chilenas de helechos, *Blechnum arcuatum* (Blechnaceae) y *Pteris semiadnata* (Pteridaceae). *Gayana - Botanica*, 73(2), 346–354. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432016000200346>
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro* (1era ed.). La Plata, Argentina: Universidad Nacional de la Plata.
- Shukla, S. P., & Khare, P. (2012). In-vitro Mass Multiplication of a Threatened Tree Fern, *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 3(1), 15–23. <https://doi.org/10.13140/2.1.2282.8168>
- Silva, J. A. T. da, Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for in vitro propagation of *Anthurium*. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–

14. <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0009>
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2008). *Fern classification. Biology and Evolution of Ferns and Lycophytes*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541827.017>
- Stadtmüller, T. (1987). *Los bosques nublados en el trópico húmedo*. Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza -CATIE-.
- Stolze, R., Benjamin, O., & Hickey, J. (1983). Ferns and Ferns Allies of Guatemala p. III. In *Ferns and Ferns Allies of Guatemala* (p. 112). Fieldiana Botany.
- Stolze, R., Mickel, J., & Smith, A. (1981). Ferns and Fern Allies of Guatemala p.II. In *Ferns and Ferns Allies of Guatemala* (p. 548). Fieldiana Botany.
- Taha, R., Haron, N., & Wafa, S. (2011). Morphological and Tissue Culture Studies of *Platyserium coronarium* , a Rare Ornamental Fern Species from Malaysia. *American Fern Journal*, 101(4), 241–251. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-101.4.241>
- The American Horticulture Society. (1999). *Plant Propagation* (1st ed.). New York: DK publishing.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26, 618–631. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Turner, M., Gardner, R., & O'neill, R. (2001). *Landscape Ecology: in theory and practice* (1st ed.). New York: Springer-Verlag.
- Vasil, I. (1991). *Scale-Up and Automation in Plant Propagation: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants Vol. 8* (1st ed.). San Diego, California: Academic Press.
- Vasil, I. K. (1990). *Plant cell and tissue culture. Plant Science* (Vol. 71). [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90019-k](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90019-k)

- Véliz, M. (2008). Diversidad florística de Guatemala. In *Guatemala y su Diversidad: un efoque histórico, cultural, biológico y económico* (1era ed., pp. 261–300). Guatemala: Consejo Nacional de Áreas Protegidas.
- Véliz, M., & Vargas, J. (2006). *Helechos Arborescentes de Guatemala: distribución, diversidad, usos y manejo*. (1era, Ed.). Guatemala.
- Winarto, B., & Teixeira da Silva, J. A. (2012). Improved micropropagation protocol for leatherleaf fern (*Rumohra adiantiformis*) using rhizomes as donor explant. *Scientia Horticulturae*, 140, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.03.017>
- Wu, H., Chen, P.-T., Yuan, L.-P., & Chen, L.-Q. (2009). An Efficient Method for Surface Sterilization and Sowing Fern Spores in vitro. *American Fern Journal*, 99(3), 226–230. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-99.3.226>
- Wu, H., Liu, X. Q., Ji, H., & Chen, L. Q. (2010). Effects of light, macronutrients, and sucrose on germination and development of the endangered fern *Adiantum reniforme* var. *sinense* (Adiantaceae). *Scientia Horticulturae*, 125, 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.004>

## 13 Anexos

### 13.1 Manuales de preparación de soluciones madre

Adaptado de Archila, (2014)

#### 13.1.1 Solución Madre 1: macroelementos (1000ml)

Colocar en un Beacker 500ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa y calentar el agua agitando. Evitar el hervor.

Pesar 82.5 gramos de Nitrato de Amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Añadir al Beacker con agua caliente.

Pesar 95 gramos de Nitrato de Potasio ( $\text{KNO}_3$ ). Añadir al Beacker con agua caliente y Nitrato de Amonio.

Agitar hasta la correcta disolución de ambos compuestos.

Aforar a 1000ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío.

#### 13.1.2 Solución madre de Cloruro de Cobalto (100ml)

Colocar en un Beacker 50ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 0.125 gramos de Cloruro de Cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Añadir al Beacker con el agua desmineralizada.

Aforar a 100ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío.

#### 13.1.3 Solución Madre 2: macroelementos y microelementos (1000ml)

Colocar en un Beacker 500ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 22 gramos Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Añadir al Beacker con agua desmineralizada.

Pesar 0.041 gr de Yoduro de potasio (KI). Añadir al Beacker con agua desmineralizada y Cloruro de Calcio.

Añadir 1ml de la Solución Madre de Cloruro de Cobalto.

Agitar hasta la correcta disolución de los compuestos.

Aforar a 1000ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío

#### 13.1.4 Solución Madre de Sulfato de Cobre (100ml)

Colocar en un Beacker 50ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 0.125 gr de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Añadir al Beacker con el agua desmineralizada.

Aforar a 100ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío.

#### 13.1.5 Solución Madre 3: microelementos (1000ml)

Colocar en un Beacker 500ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 18.5 gr de Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

Pesar 0.84 gr de Sulfato de Manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y agregarlos a la solución hasta que se disuelva.

Pesar 0.43 gr de Sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) agregarlos a la solución anterior.

Añadir 1ml de la Solución Madre de Sulfato de Cobre.

Agitar hasta la correcta disolución de los compuestos.

Aforar a 1000ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío

#### 13.1.6 Solución Madre de Molibdato de de Sodio (100ml)

Colocar en un Beacker 50ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar.25 gramos de Molibdato de Sodio ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Añadir al Beacker con el agua desmineralizada.

Aforar a 100ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío.

#### 13.1.7 Solución madre 4: Microelementos (1000ml)

Colocar en un Beacker 500ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 0.31 gr de Ácido Bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). Añadir al Beacker con el agua desmineralizada.

Pesar 8.5 gr de Fosfato de Potasio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Añadir a la solución anterior.

Añadir 1ml de la Solución Madre de Molibdato de Sodio.

Agitar hasta la correcta disolución de los compuestos.

Aforar a 1000ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío

#### 13.1.8 Solución madre 5: Solución de Hierro (1000ml)

Colocar en un Beacker 500ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar y calentar el agua evitando el hervor.

Pesar 1.86 gramos de  $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Añadir al Beacker con el agua desmineralizada. Seguir calentando. Evitar el hervor.

Pesar 1.39 gr de sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Añadir a la solución anterior. La mezcla se tornará clara, para luego cambiar a amarillo.

Agitar hasta la correcta disolución de los compuestos.

Aforar a 1000ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío en un frasco ámbar o en un recipiente tapado para evitar la degradación por la luz.

#### 13.1.9 Solución madre de Vitaminas (500ml)

Colocar en un Beacker 250ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 0.05 gr de Ácido Nicotínico. Añadir al agua desmineralizada.

Pesar 0.05 gr de Piridoxina. Añadir a la solución anterior.

Pesar 0.12 gr de Tiamina. Añadirlo a la solución anterior.

Pesar 0.20 gramos de Glicina. Añadirlo a la solución anterior.

Pesar 10 gr de Myo-Inositol. Añadirlo a la solución anterior.

Agitar hasta la correcta disolución de los compuestos.

Aforar a 500ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar en frío en un frasco ámbar o en un recipiente tapado para evitar la degradación por la luz.

#### 13.1.10 Solución de enmienda de pH: Hidróxido de Sodio [1M] (250ml)

Colocar en un Beacker 150ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Pesar 9.89g de NaOH. Poco a poco. Agitar.

El recipiente se calentará por la reacción exotérmica. Manejar con cuidado.

Aforar a 250ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar a temperatura ambiente en un frasco ámbar o en un recipiente tapado para evitar la degradación por la luz.

13.1.11 Solución de enmienda de pH: Ácido Clorhídrico [1M] (250ml)

Colocar en un Beacker 150ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Con una pipeta tomar 24.5ml de HCL fumante. Añadir lentamente.

El recipiente se calentará por la reacción exotérmica. Manejar con cuidado.

Aforar a 250ml con agua desmineralizada estéril.

Almacenar a temperatura ambiente en un frasco ámbar o en un recipiente tapado para evitar la degradación por la luz.

### **13.2 Manual de elaboración 1L de medio M&S sin hormonas**

Colocar en un Beacker 500ml de agua desmineralizada estéril. Colocar en un agitador magnético con estufa. Agitar.

Añadir 20ml de cada Solución Madre de macro y microelementos.

Añadir 5ml de la Solución Madre de vitaminas a la solución anterior.

Pesar 30g de azúcar de mesa. Añadir a la solución anterior.

Aforar a 1L con agua desmineralizada

Medir el pH con el potenciómetro. Llevarlo a 5.6-5.8 con las enmiendas de ser necesario.

Añadir 7.5g de Agar (esta cantidad puede variar según la marca o calidad del agar a utilizar)

Llevar a punto de ebullición y esperar que la solución se torne traslúcida.

Servir en los recipientes deseados

### **13.3 Costos completos de producción**

Se presentan a continuación los costos completos de la preparación y producción de los tres métodos empleados. Es importante mencionar que la mano de obra se colocó a Q22.72 la hora, mismo salario de la Corporación Tak Centroamérica maneja para los técnicos de laboratorio y los investigadores de campo.

También se manejó un promedio para el costo de la extracción de las esporas, ya que las especies presentaron diferentes niveles de dificultad y tiempo de extracción manual.

## 13.3.1 Costos de la extracción de esporas

ESPECIE	DESCRIPCIÓN	Fronde colectados	g obtenidos de la extracción	Promedio de g /Fronde	POTENCIAL (helechos que se generarán con 50% de éxito de germinación)	PROMEDIO TIEMPO EXTRACCIÓN (h)	COSTO POR EXTRACCIÓN (horas invertidas)	COSTO DE EXTRACCIÓN DE 0.12 g
<i>Cyathea divergens</i>	Cyatheaceae de fácil extracción	6	8.01	1.335	5.01E+07	0.5	Q 11.36	Q 1.02
<i>Sphaeropteris horrida</i>	Cyatheaceae de fácil extracción	4	19.45	4.863	1.82E+08	4.5	Q102.24	Q 2.52
<i>Adiantum sp.</i>	Pteridaceae de soros pequeños con poca producción esporas	26	9.15	0.352	1.32E+07	7.5	Q 170.40	Q 58.10
<i>Nephrolepis exaltata</i>	Davalliaceae de extracción soro por soro	31	12.18	0.393	1.47E+07	0.5	Q 11.36	Q 3.47
<i>Asplenium nidus</i>	Aspleniaceae de soros lineales con poca liberación de esporas	10	17.24	1.724	6.47E+07	1	Q 22.72	Q 1.58
<b>TOTAL</b>		77	66.03	0.8575	3.25E+08	14	Q 318.08	Q 66.70
							<b>Promedio</b>	Q 22.23

## 13.3.2 Costos de producción de 1 prueba en sustrato peat-moss preparado

ASPECTO	DESCRIPCIÓN	UNIDADES POR PRUEBA	UNIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO POR PRUEBA
<b>Extracción de esporas</b>	Frascos, agujas de disección, cuchilla y Mano de Obra	0.12	g por prueba	Q 22.23	Q 22.23
	Mano de obra	1	hora	Q 22.72	Q 22.72
<b>Preparación 1 caja con sustrato</b>	Caja de acrílico tipo camisera	1	unidad experimental	Q 54.00	Q 54.00
	Sustrato	3	L	Q 6.87	Q 20.61
	Agua para esterilización sustrato	500	ml	Q 0.0102	Q 5.10
	<b>TOTAL protocolo desinfección esporas</b>				<b>Q 102.43</b>
<b>Desinfección esporas (0.12g por prueba)</b>	Agua potable (Garrafón)	300	ml	Q 0.0102	Q 0.24
	Cloro comercial	80	ml	Q 0.1087	Q 0.90
	Alcohol 70% (Galón)	100	ml	Q 0.0102	Q 1.02
	Filtros para cafetera	1	uni	Q 0.1087	Q 0.11
	<b>TOTAL protocolo desinfección esporas</b>				<b>Q 2.26</b>
	Mano de obra	0.5	hora de trabajo de siembra	Q 22.72	Q 11.36
	Mascarilla	1	reutilizable hasta 3 meses	Q 0.70	Q 0.70
	Guantes	1	par por siembra	Q 0.01	Q 0.01
	Alcohol 70%	0.1	litro por siembra	Q 0.02	Q 0.00
	Jeringa 5ml	1	unidad por especie	Q 3.00	Q 3.00
	Lysol ® (Lata grande en aerosol=538g)	1	g	Q 0.12	Q 0.12
	<b>TOTAL siembra en sustrato</b>				<b>Q 15.19</b>
<b>TOTAL COSTOS DE PRODUCCIÓN DE UNA PRUEBA DE ESPORAS EN SUSTRATO</b>					<b>Q 142.12</b>
<b>TOTAL COSTOS DE 5 CAJAS SEMBRADAS DE PRUEBA DE ESPORAS</b>					<b>Q 710.58</b>

## 13.3.3 Costos de producción de 1 prueba con sustrato de sintético de tela

ASPECTO	DESCRIPCIÓN	UNIDADES POR PRUEBA	UNIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO POR PRUEBA
<b>Extracción de esporas</b>	Frascos, agujas de disección, cuchilla y Mano de Obra	0.12	g por prueba	Q 22.23	Q 22.23
	Mano de obra	0.5	hora	Q 22.72	Q 11.36
<b>Preparación 1 caja con sustrato</b>	Caja de acrílico tipo camisera	1	unidad experimental	Q 54.00	Q 54.00
	Tela y algodón	3	lb de Tela y algodón	Q4.17	Q 12.50
	Agua para esterilización sustrato	500	ml	Q 0.0102	Q 5.10
	<b>TOTAL protocolo desinfección esporas</b>				
<b>Desinfección esporas (0.12g por prueba)</b>	Agua potable (Garrafón)	300	ml	Q 0.0102	Q 0.24
	Cloro comercial	80	ml	Q 0.1087	Q 0.90
	Alcohol 70% (Galón)	100	ml	Q 0.0102	Q 1.02
	Filtros para cafetera	1	uni	Q 0.1087	Q 0.11
	<b>TOTAL protocolo desinfección esporas</b>				<b>Q</b>
	Mano de obra	0.5	hora de trabajo de siembra	Q 22.72	Q 11.36
	Mascarilla	1	reutilizable hasta 3 meses	Q 0.70	Q 0.70
	Guantes	1	par por siembra	Q 0.01	Q 0.01
	Alcohol 70%	0.1	litro por siembra	Q 0.02	Q 0.00
	Jeringa 5ml	1	unidad por especie	Q 3.00	Q 3.00
	Lysol ® (Lata grande en aerosol=538g)	1	g	Q 0.12	Q 0.12
<b>TOTAL siembra en sustrato</b>					<b>Q 15.19</b>
<b>TOTAL COSTOS DE PRODUCCIÓN DE UNA PRUEBA DE ESPORAS EN SUSTRATO</b>					<b>Q 22.65</b>
<b>TOTAL COSTOS DE 5 CAJAS SEMBRADAS DE PRUEBA DE ESPORAS</b>					<b>Q 613.24</b>

13.3.4 Costos de producción de una prueba de siembra de esporas de 10 frascos *in vitro*

ASPECTO	DESCRIPCIÓN	UNIDADES POR PRUEBA	UNIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO POR PRUEBA (10 frascos)
<b>Extracción de esporas</b>	Frascos, agujas de disección, cuchilla y Mano de Obra	0.12	g por prueba de 10 frascos	Q 2.22	Q 22.23
<b>Preparación 1L de medio (20 frascos de 50ml c/u)</b>	Mano de obra	1	hora	Q 22.72	Q 22.72
<b>Desinfección esporas (0.12g por prueba)</b>	Agua Desmineralizada (Garrafón)	300	ml	Q 0.0008	Q 0.24
	Cloro comercial	80	ml	Q 0.0112	Q 0.90
	Tween 20®	2	gts	Q 0.9900	Q 0.10
	Alcohol 70% (Galón)	100	ml	Q 0.0102	Q 1.02
	Filtros para cafetera	1	uni	Q 0.1087	Q 0.11
<b>TOTAL protocolo desinfección esporas</b>					<b>Q 2.36</b>
<b>Esterilización material</b>	Frascos, medio, cristalería, agua e instrumentos en autoclave	1	hora de gas para el autoclave	Q 0.32	Q 0.32
	Mano de obra	1	hora	Q 22.72	Q 22.72
<b>TOTAL Esterilización material</b>					<b>Q 23.04</b>
<b>Esterilización campana</b>	Papel mayordomo	6	cuadrado	Q 0.05	Q 0.30
	Lysol® (Lata grande en aerosol=538g)	1	g	Q 0.12	Q 0.12
	Alcohol al 70% (aplicación en atomizador)	10	ml	Q 0.0086	Q 0.09
<b>TOTAL protocolo esterilización campana</b>					<b>Q 0.51</b>
<b>Siembra esporas (0.12g de esporas y 10 frascos x especie)</b>	Papel periódico	1	1 recuadro x siembra	Q 0.0173	Q 0.02
	Bisturí #11	1	1 x especie	Q 1.25	Q 1.25

Uso Campana de flujo laminar	2	hora de siembra	Q 1.30	Q 2.60
Mano de obra (técnico de laboratorio - incluye tiempo de esterilización de esporas en campana)	2	hora de uso de la campana	Q 22.72	Q 45.44
Mascarilla	1	reutilizable hasta 3 meses	Q 0.70	Q 0.70
Guantes	1	par por siembra	Q 1.40	Q 1.40
Alcohol 70%	2	litro por 2 horas de campana	Q 0.02	Q 0.04
Alcohol 95%	0.7	litro por 2 horas de campana	Q 8.61	Q 6.03
Bolsa de basura grande para descarte	1	bolsa por siembra	Q 0.15	Q 0.15
Frasco con 50ml de medio (ya estéril)	10	por prueba	Q 1.56	Q 15.56
<b>TOTAL protocolo de siembra en campana</b>				<b>Q 73.19</b>
<b>TOTAL COSTOS DE PRODUCCIÓN DE UNA PRUEBA DE ESPORAS</b>				<b>Q 144.05</b>
<b>TOTAL COSTOS DE 1 FRASCO SEMBRADO PRUEBA DE ESPORAS</b>				<b>Q 14.40</b>

13.3.5 Costos de producción de subcultivos *in vitro*

ASPECTO	DESCRIPCIÓN	UNIDADES POR PRUEBA	UNIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO POR PRUEBA
<b>Esterilización material</b>	Frascos, medio, cristalería, agua e instrumentos en autoclave	1	hora	Q 0.32	Q 0.32
	Mano de obra	2	hora	Q 22.72	Q 45.44
<b>TOTAL Esterilización material</b>					<b>Q 45.76</b>
<b>Preparación 1L de medio (20 frascos de 50ml c/u)</b>	Mano de obra	1	hora	Q 22.72	Q 22.72
<b>Esterilización campana</b>	Papel mayordomo	6	cuadrado	Q 0.05	Q 0.30
	Lysol® (Lata grande en aerosol=538g)	1	g	Q 0.12	Q 0.12
	Alcohol al 70% (aplicación en atomizador)	10	ml	Q 0.009	Q 0.09
<b>TOTAL protocolo esterilización campana</b>					<b>Q 0.51</b>
<b>Siembra gametofitos/ esporofitos jóvenes</b>	Papel periódico	10	1 recuadro x siembra	Q 0.0173	Q 0.17
	Bisturí #11	1	1 x siembra	Q 1.25	Q 1.25
	Uso Campana de flujo laminar	1	hora de siembra	Q 1.30	Q 1.30
	Mano de obra (técnico de laboratorio)	1	hora de siembra	Q 22.72	Q 22.72
	Mascarilla	1	reutilizable hasta 3 meses	Q 0.70	Q 0.70
	Guantes	1	par por siembra	Q 1.40	Q 1.40

Alcohol 70%	1	litro por hora en campana	Q 5.85	Q 5.85
Alcohol 95%	0.3	litro por hora en campana	Q 3.69	Q 1.11
Bolsa de basura grande para descarte	1	bolsa por siembra	Q 0.15	Q 0.15
Frasco con 50ml de medio (ya estéril)	10	por prueba	Q 1.56	Q 15.56
<b>TOTAL protocolo de siembra en campana</b>				<b>Q 50.21</b>
<b>TOTAL COSTOS DE PRODUCCIÓN DE 1 SUBCULTIVO DE 10 FRASCOS</b>				<b>Q 119.20</b>
<b>TOTAL COSTOS DE 1 FRASCO DE UN SUBCULTIVO</b>				<b>Q 11.92</b>

### 13.3.6 Protocolos de desinfección evaluados:

Los protocolos *in vitro* ejecutan un proceso de desinfección previa a la siembra, como se ha mencionado antes. A continuación, se presentan los protocolos de desinfección evaluados:

Propuesta de Pence, 2015:

Para el primer intento en el Laboratorio de Agronomía, así como en el primer intento de la siembra convencional y Feldhoff en el Jardín Botánico CECON-USAC, se adaptó el protocolo propuesto por Pence, (2015), el cual consiste en desinfección de las esporas usando hipoclorito de sodio al 5% por 15 minutos, seguido de alcohol al 70% por 20 minutos y posterior lavado en agua desmineralizada. Para el segundo intento se utilizó hipoclorito sódico al 3.5% por 15 minutos, añadiendo una fase de 25 minutos en alcohol al 70% y 1 lavado de agua desmineralizada previamente esterilizada de 10 minutos.

#### Modificaciones probadas durante la fase experimental

Siembra	Protocolo	Concentración Hipoclorito de sodio	Tiempo	Concentración Etanol	Tiempo	Lavado(s) con Agua Desmineralizada	Resultados
1	Pence, 2015	5%	15min	70%	20 min	1	No hubo germinación
	Modificación 1	5%	15min	70%	10min	3	98% contaminación
2	Protocolo AGROSAK	20% + 0.02% Tween	10min	70%	1min	3	No hubo germinación
	Modificación 2	2.30%	15min	70%	15min	3	90% contaminación
	Modificación 3	3.50%	25min	70%	15min	3	80% contaminación
	Modificación 4	5.00%	15min	70%	15min	3	70% contaminación y sin germinación
	Modificación 5	4% + 0.02% Tween	15min	70%	15min	3	73% rendimiento global con germinación en todas las especies

