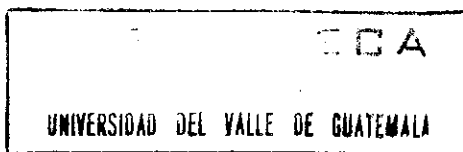


**REPRODUCCION Y PROPAGACION DE ALGUNAS ESPECIES DE
HELECHOS ARBORESCENTES**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Biología

REPRODUCCION Y PROPAGACION DE ALGUNAS ESPECIES DE HELECHOS
ARBORESCENTES

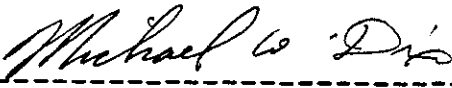
JEANNETTE MARGARITA RUIZ ROBLETO



Trabajo de investigación presentado para
optar al grado académico de
Licenciada en Biología


GUATEMALA
1995

Vo. Bo.:

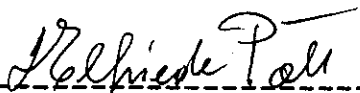
(f.) 

Dr. Michael Dix

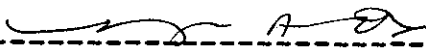
Tribunal:

(f.) 

Dr. Michael Dix

(f.) 

Dra. Elfriede Poll

(f.) 

Dra. Margaret Dix

Fecha de Aprobación: 17 de octubre de 1995

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	
a. Importancia de la reproducción y propagación de helechos arborescentes	1
b. Características de los helechos	5
c. Características del ciclo de vida de los helechos	6
d. Descripción de las Fam. Dicksoniaceae y Cyathea-ceae	9
e. Descripción de los géneros	10
f. Características de las esporas	12
g. Determinación de un método para diseñar medios de cultivo artificiales adecuados	14
h. Medios de cultivo	15
II. OBJETIVOS	16
III. METODOLOGIA	17
IV. RESULTADOS	
a. Tratamiento con medios de cultivo	23
b. Helechos arborescentes, su germinación y desarrollo, según medios de cultivo	25
c. Ilustración de esporas, esporofito, gametofito y esporofito de helechos arborescentes	38
d. Revisión taxonómica preliminar	42
e. Conteo de esporas	45

	Páginas
V. DISCUSION	
a. Esterilización	46
b. Colecta de esporas	46
c. Medios de cultivo	47
d. Esporas y germinación	48
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	56
VIII. LITERATURA CITADA	57
APENDICE 1	
MEDIO MS PARA EL CULTIVO DE ESPORAS	60
APENDICE 2	
HOJA DE DATOS	62
APENDICE 3	
GRAFICAS	63

LISTA DE TABLAS

TABLA

	Páginas
1. Porcentaje de contaminación en diferentes especies con tres tratamientos de Hipoclorito de Sodio en Agar(MS) y Agar Líquido(MS).	24
2. Helechos arborescentes, su germinación y desarrollo, según medios de cultivo.	26
3. Helechos arborescentes no germinados.	28
4. Número de plantas que desarrollaron hasta esporofito.	31
5. Fechas de colecta, siembra y éxito en germinación de gametofito hasta desarrollo de esporofito en diferentes medios de cultivo artificiales para cada especie.	33
6. Comparación en meses y días, desde fecha de siembra de esporas para cada especie hasta desarrollo de esporofito.	35
7. Número de pruebas donde hubo germinación de esporas hasta esporofito para cada especie.	37
8. Descripción de esporas de diferentes especies de helechos arborescentes.	37

LISTA DE LAMINAS

LAMINA

	páginas
1. Fam. Dicksoniaceae. Esporas y Esporangio 1 y 2. <u>Cibotium regale</u> 3 y 4. <u>Dicksonia gigantea</u>	38
2. Fam. Cyatheaceae. Esporas y Esporangio 5 y 6. <u>Alsophila salvinii</u> 7 y 8. <u>Cyathea tuerckheimii</u> 9 y 10. <u>Lophosoria quadripinnata</u> .	39
3. Fam. Dicksoniaceae. Gametofito y Esporofito 1. <u>Cibotium regale</u> 2. <u>Dicksonia gigantea</u>	40
4. Fam. Cyatheaceae. Gametofito y Esporofito 3. <u>Alsophila salvinii</u> 4. <u>Cyathea tuerckheimii</u> 5. <u>Lophosoria quadripinnata</u>	41

LISTA DE GRAFICAS

GRAFICA

	páginas
1-5. Tiempo en germinar de esporofito.	63
6. Plantas germinadas en todos los medios.	68

DEDICO ESTA TESIS A:

Dios

Mis abuelos:

Fernando Tabbag
Juanita Tabbag

Mis padres:

Ernesto Ruiz Briceño
Myriam de Ruiz

Mis hermanos:

Fadel Ruiz
Giovanni Ruiz
Marcelo Ruiz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Michael Dix, por su ayuda, asesoría y orientación a lo largo de la realización de este trabajo de tesis. Asimismo a la Dra. Elfriede Pöll por su asesoría, con admiración y gratitud en las enseñanzas a lo largo de mi carrera universitaria.

A la Dra. Margaret Dix, por su colaboración y conocimientos adquiridos.

Al Lic. Marcelino Cortez P. por su apoyo, comprensión e infinita paciencia brindada para la realización de este trabajo.

Reconozco en general, la ayuda y apoyo que me brindaron Luis Ríos y Rosemarie Bressani de Samayoa.

RESUMEN

Se colectaron muestras frescas de frondes fértiles y con esporangios maduros, pecíolo y rizoma de Cibotium regale Versch. & Lem., Dicksonia gigantea Karst., Alsophila salvinii Hook., Cyathea tuerckheimii Maxon y Lophosoria quadripinnata (Gmel.) C. Chr., se colectaron las esporas de éstos y se prepararon especímenes de herbario para referencia.

Se probaron siete medios artificiales de cultivo para desarrollar métodos adecuados para la germinación de las esporas y se colocaron en laboratorio bajo condiciones de luz y temperatura controlados. Los medios probados eran: tierra-arena-nutriente, tierra-arena, arena-nutriente, arena, broza, agar y agar líquido. El medio de cultivo artificial más adecuado para la germinación de esporas fue tierra-arena-nutriente.

Se logró la germinación de esporas hasta crecimiento de esporofito de las cinco especies de helechos arborescentes colectadas. Se obtuvo mayor éxito en la germinación de esporas hasta crecimiento de esporofito con la especie Cyathea tuerckheimii y el medio más adecuado fue tierra-arena-nutriente. Sin embargo, la tasa de germinación de esporas y luego crecimiento hasta esporofito, fue baja.

Se realizó una descripción ilustrada de esporas, esporangio, gametofito y esporofito de cada especie. Las esporas de las cinco especies de helechos arborescentes son típicamente triletes.

También se realizó una revisión taxonómica de la Familia Cyatheaceae y de la Familia Dicksoniaceae en Guatemala, en donde existen 18 especies de helechos arborescentes.

Se concluye que aún es muy difícil lograr la germinación de esporas y cultivo de helechos arborescentes hasta esporofito en medios artificiales. Para lograr el uso sustentable de los helechos arborescentes se necesita de más investigación.

I. INTRODUCCION

a. Importancia de la reproducción y propagación de algunas especies de helechos arborescentes

Los helechos arborescentes corren el peligro de extinción por la destrucción de su hábitat natural, debido a la sobreexplotación de éstos y por la conversión de áreas naturales para usos agrícolas. Además representan un grupo de plantas seriamente amenazadas a causa de la fuerte demanda de sus tallos y troncos para elaborar el sustrato conocido, comercialmente, como "chipe".

No hay estudios relacionados con la germinación de esporas de diferentes especies de helechos arborescentes. Logrando la germinación de esporas y la producción de plántulas de helechos arborescentes en gran escala, éstas pueden ser llevadas a los lugares todavía intactos de sus hábitats; asegurando así la conservación de dichas especies y encontrar una manera de propagación para fines comerciales.

El chipe lo utilizan para sostener diversas plantas epífitas. Es usado en dos formas: macetas cortadas de los troncos (actualmente representan raíces adventicias) y a partir del moldeamiento de los tallos y troncos triturados. El material triturado, mezclado con otros medios tales como piedra pómez, corteza de pino y humus, es un medio muy usado para la siembra en macetas de orquídeas. El chipe es considerado un material de primera calidad para los coleccionistas y cultivadores de orquídeas; asimismo, en viveros de plantas

ornamentales goza de mayor predilección. También se le usa como tutor de plantas ornamentales trepadoras, especialmente de los géneros como Philodendron, Monstera, Peperomia, Anthurium, etc.

Debido a la gran importancia comercial, algunas personas se han dedicado a aprovechar fuertes cantidades de estas plantas.

Generalmente cortan los helechos de mayor edad y helechos más pequeños, si el objetivo es aprovechar el chipe, como fibra o los colectan con las raíces para venderlos como ornamentales. Esta práctica causa serios desequilibrios ecológicos en las poblaciones de helechos arborescentes en los bosques, con la reducción del número de esporas que son liberadas durante sus ciclos de vida, y de no haber controles adecuados, en pocos años podrían extinguirse totalmente. De acuerdo con informes, esta actividad es realizada también como práctica de sobrevivencia de personas de escasos recursos.

Los tricomas de muchos helechos arborescentes son utilizados por aves para construir sus nidos.

En Quetzaltenango, los troncos del género Sphaeropteris, se utilizan en la construcción de viviendas (Stolze, 1976).

Los helechos arborescentes son plantas muy vistosas que crecen en forma natural en la mayoría de bosques tropicales y subtropicales de Centroamérica. En algunas áreas son el componente dominante de la vegetación. Algunas especies crecen en la sombra como por ejemplo Alsophila salvinii, que es abundante en sotobosques de bosques maduros, y otras especies

crecen en lugares abiertos como Cyathea tuerckheimii y Lophosoria quadripinnata.

En nuestro país se les encuentra en regiones con altitudes desde 200 metros sobre el nivel del mar, hasta 3300 metros sobre el nivel del mar, ya sea en bosques tropicales húmedos y pluviales de baja altura sobre el nivel del mar, en bosques subtropicales premontano húmedos, muy húmedos y pluviales y en bosques montano y montano bajo húmedos y muy húmedos (Stolze, 1976).

En Guatemala han cobrado, tanto interés comercial que se encuentran dentro del Decreto No. 65-88, Artículo 2 del Organismo Legislativo, donde dice literalmente que "Se prohíbe la exportación de especímenes, partes o derivados de helechos arborescentes del género Cyathea, conocido comúnmente como chupte, chut, chute y chipe, que no estén debidamente procesados"(Organismo Legislativo, 1988). Además, se encuentran dentro del listado de CITES, Apéndice II, los helechos arborescentes de los géneros Cyathea y Dicksonia.

Existen dos familias de helechos arborescentes. Según Stolze(1976) se distribuyen como sigue.

Familia Cyatheaceae, con 16 especies en Guatemala:

Alsophila salvinii Hook.

Cyathea fulva (Mart. & Gal.) Fée

Cyathea multiflora J. E.

Cyathea tuerckheimii Maxon

Lophosoria quadripinnata (Gmel.) C. Chr.

Nephelea mexicana (Schlecht. & Cham.) Tryon

Nephelea tryoniana Gastony

Sphaeropteris horrida (Liebm.) Tryon

Sphaeropteris myosuroides (Liebm.) Tryon

Trichipteris bicrenata (Liebm.) Tryon

Trichipteris costaricensis (Kuhn) Barr.

Trichipteris mexicana (Mart.) Tryon

Trichipteris microdonta (Desv.) Tryon

Trichipteris pansamalana (Maxon) Tryon

Trichipteris schiedeana (Presl) Tryon

Trichipteris ursina (Maxon) Tryon

Familia Dicksoniaceae, con dos especies en Guatemala:

Cibotium regale Versch. & Lem.

Dicksonia gigantea Karst.

b. Características de los helechos

Las características que diferencian a los helechos que integran el orden Filicophyta de las otras plantas vasculares inferiores sin semilla, son la estructura de la hoja, la anatomía del tallo, la localización de los esporangios y el patrón de desarrollo.

Típicamente los helechos poseen grandes hojas compuestas, (ramificadas) a las que se denominan frondes, que van desarrollándose conforme crecen; los esporangios surgen sobre los frondes en grupos llamados soros (Villean, Solomon y Davis, 1987). Los bosques extintos de helechos contribuyeron a formar los actuales depósitos de carbón de hulla. Algunos de esos helechos arborescentes tenían troncos altos y delgados, constituidos por el tallo y una masa circundante de raíces unidas por medio de pelos.

Los helechos aparecieron en el período Devónico y ayudaron a purificar la atmósfera, la cual hasta entonces había tenido una gran proporción de dióxido de carbono (Fuller et al, 1974).

c. Características del ciclo de vida de los helechos (Ver Fig.1)

Los helechos se diferencian de las plantas con semilla porque las esporas se forman en esporangios situados en el envés de ciertas hojas. El esporofito vive durante muchos años y produce esporas varias veces al año después de la madurez.

Las esporas son liberadas en el momento justo, de manera que son llevadas por el viento y caen al suelo y dan origen después de cierto tiempo de desarrollo, a gametofitos planos fotosintéticos, con forma de corazón, denominado prótalo, crece en lugares húmedos y sombreados. Cada gametofito produce varios rizoides que penetran en el suelo, anclándolo y absorbiendo agua y sales. Los órganos sexuales femeninos y masculinos, arquegonios y anteridios respectivamente, se forman en la superficie inferior del gametofito.

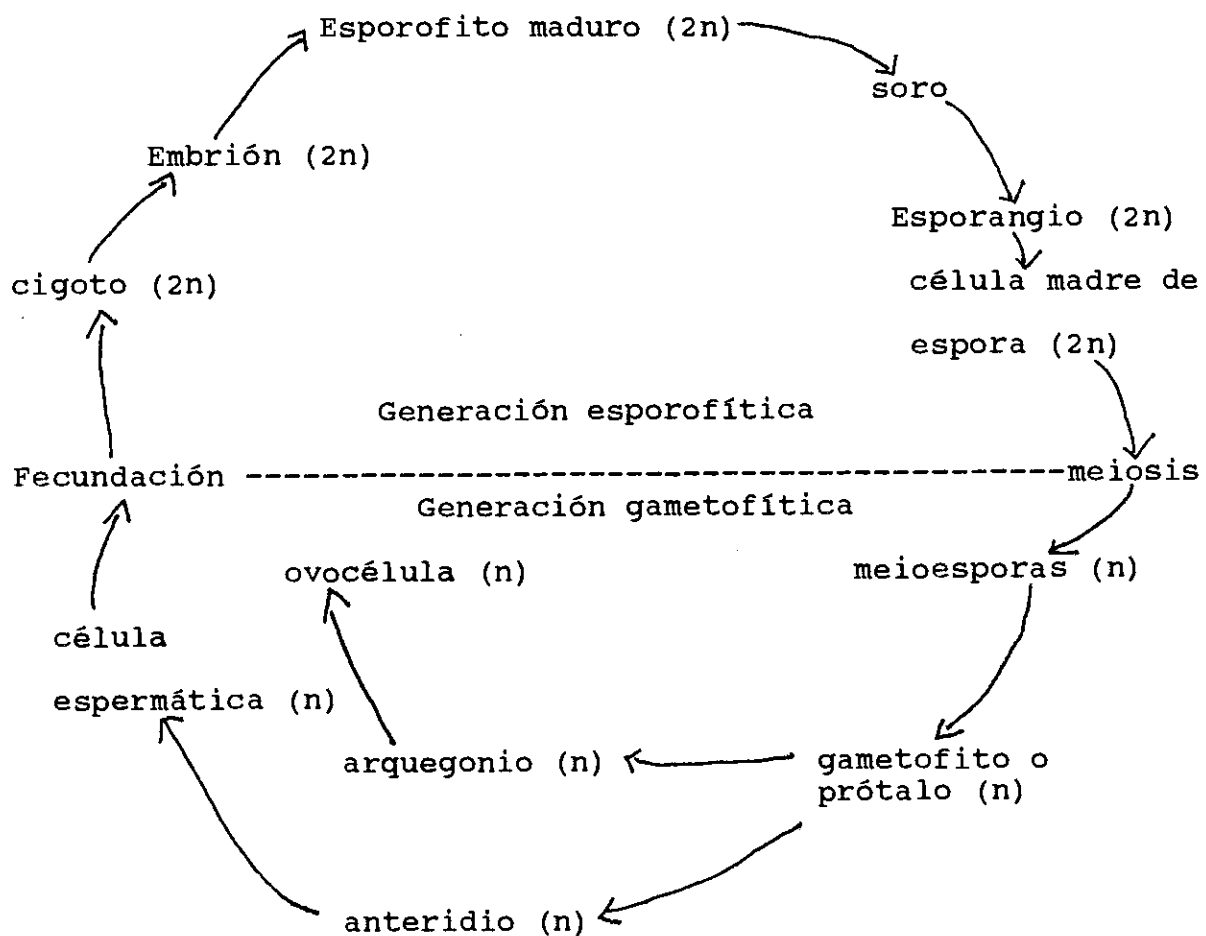
Cada arquegonio contiene un solo óvulo. Los anteridios, que se localizan en un extremo del prótalo, dan origen a varios anterozoides flagelados o espermatozoides. Los anterozoides son liberados después de una lluvia y son atraídos por una sustancia química producida por el arquegonio, nadan en el agua adherida a la superficie inferior del prótalo hasta llegar al óvulo. Los anteridios suelen formar y liberar sus anterozoides antes de que maduren los arquegonios del mismo gametofito. Por esta razón, el anterozoide de una planta suele fecundar el óvulo de otra; el cigoto resultante se desarrolla para formar el nuevo esporofito. El óvulo

fecundado empieza a desarrollarse hasta que se convierte en un embrión de esporofito dentro del arquegonio. Inicialmente el esporofito se desarrolla como un parásito del gametofito, pero muy pronto adquiere sus propias raíces, tallos y hojas, con lo que se convierte en una planta independiente y se cierra el ciclo(Villee, Solomon y Davis, 1987).

Puede ocurrir que un solo prótalo lleve tanto los anteridios como los arquegonios, o puede ser también, funcionalmente, sólo masculino o sólo femenino. El esporofito diploide está bien adaptado para la vida terrestre. Posee tejidos de conducción y sostén y, a diferencia de los musgos, es nutricionalmente independiente del gametofito. No obstante, la generación gametofítica sólo puede sobrevivir en donde hay abundancia de humedad y sombra, pero para la unión de los óvulos y espermatozoides se necesita un medio acuoso(Villee, Solomon y Davis, 1987). A menudo, el soro está recubierto y protegido durante la maduración del esporangio por una falda de tejido: el indusio. En la mayoría de los helechos que producen soros, el esporangio individual consta de un breve pedículo y una cápsula terminal. Dentro de la cápsula, células madres de la espora experimentan meiosis para producir de 16 a 64 meiosporas.

La primera hoja de follaje suele estar lobulada dicotómicamente y es nervada; sin embargo, las hojas desarrolladas subsiguientemente presentan cada vez más la forma de fronde, característica de la especie, hasta que, finalmente, se alcanza la forma madura(Fuller et al, 1974).

FIGURA 1: Ciclo de vida de los helechos



(Fuller et al, 1974)

d. Descripción de las Familias Dicksoniaceae y Cyatheaceae

Familia Dicksoniaceae:

Son grandes plantas terrestres, con tallos horizontales o generalmente erguidos, frecuentemente gruesos y parecidos a troncos, provistos a veces de raíces adventicias densas. Poseen hojas anchas y muy grandes, hasta varios metros de largo, con vernación circinada, monomorfas o dimorfas; pecíolo rígido, liso hasta pubescente; en la base con frecuencia densamente lanudo, no articulado en el tallo; la lámina 2-4 pinada, cartácea hasta subcoriácea; la cubierta consiste de tricomas no ramificados; escamas ausentes; los soros marginales situados al final de las venas, tienen forma de copa o son bivalvados. Esporangio corto hasta largamente peciolado. En cada esporangio de 48-64 esporas, triletes, tetraédricas; exina lisa hasta granulosa (Stolze, 1976).

Familia Cyatheaceae:

Son grandes plantas terrestres, con tallos horizontales o comúnmente erguidos; frecuentemente gruesos con forma de troncos y algunas veces provistos de raíces adventicias densas. Poseen hojas pequeñas hasta muy grandes hasta varios metros de largo, vernación circinada, esencialmente monomorfas. Pecíolos imperfectamente deciduos, se desprenden irregularmente (no obstante, en algunas especies, las bases de los pecíolos maduros eventualmente caen para manifestar distintas, regulares y

espaciosas cicatrices). La lámina 1 pinada. El indumento consiste de tricomas o escamas o ambas; soro abaxial en las venas, redondo, numerosos esporangios, ovoide a piriforme; en cada esporangio de 16-64 esporas, triletes, tetraédricas hasta subglobosas(Stolze, 1976).

e. Descripción de los géneros

Familia Dicksoniaceae

CIBOTIUM

Posee tallos firmes y tendidos, hasta ascendentes, erguidos y fuertes. Tiene hojas grandes hasta muchos metros de largo, pecíolo liso excepto en la base, densamente con tricomas rojizos. Lámina comúnmente tripinada y monomorfa; con soros al final de las venas, indusio bivalvado. Esporangios con annulus oblicuo.

Esporas tetraédricas, triletes(Stolze, 1976).

DICKSONIA

Posee tallos erguidos, gruesos y parecidos a troncos. Raramente tendidos o ascendentes, hasta 6 m de alto y 40 cm de diámetro. Con hojas grandes hasta muchos metros de largo, pecíolo liso o levemente espinoso con tricomas persistentes en la base, de color café amarillento o café rojizo. Lámina bipinada o tripinada. Soros al terminar las venas, indusio bivalvado. Esporangios con annulus oblicuo(Stolze, 1976).

Familia Cyatheaceae

ALSOPHILA

Con tallos erguidos, gruesos y parecidos a troncos. Hojas hasta muchos metros de largo. Pecíolo negro, liso o levemente espinoso, con escamas persistentes en la base o raramente espinas cónicas en la base. Lámina bipinada o tripinada, color del raquis igual que el del pecíolo. Soros dispuestos en las venas cerca de vena central. Indusio con forma de escama o sin indusio. 16 esporas o excepcionalmente 64 esporas por esporangio(Stolze, 1976).

CYATHEA

Con tallos erguidos, gruesos y parecidos a troncos. Hojas hasta muchos metros de largo. Pecíolo liso o espinoso, escamas cafés con márgenes pálidos o blanquizcos. Lámina bipinada o profundamente hendida. 64 esporas por esporangio. Soros con indusio globoso o sólo cubriéndolos parcialmente(Stolze, 1976).

LOPHOSORIA

Son plantas acaulescentes o con tallos erguidos, fuertes y parecidos a troncos hasta de 1m de alto. Hojas hasta muchos metros de largo, sin escamas. Pecíolo hasta 1.5 m de largo, café claro u oscuro, liso, densamente lanoso en la base con tricomas cafés o de color herrumbre. Lámina tripinada, raquis café claro o color paja, veloso o liso. Un soro en cada vena, sin indusio. 64 esporas por esporangio, blanquizcas o amarillo-pálidas, globosas, tetraédricas(Stolze, 1976).

f. Características de las esporas

Los caracteres relacionados con las esporas, como en forma, tamaño, ornamentación y estructura, son de gran utilidad en la sistemática de los pteridofitos y han servido también, en ocasiones, para intentar establecer posibles relaciones filogenéticas entre diferentes órdenes, familias y taxones de rango inferior.

A partir de la década de los cincuentas, se ha visto incrementado el estudio de los caracteres palinológicos en pteridofitos, y los resultados que se obtienen son cada vez más satisfactorios, si se tiene en cuenta que los medios de observación disponibles ofrecen en la actualidad grandes posibilidades (Salvo Tierra, 1990).

Tipos básicos esporales

En cuanto a la forma, las esporas pueden presentar simetría radial o bilateral. Cada esporocito da lugar, tras la meiosis a una tétrade de esporas que, finalmente, se separan; la parte de la espora de la tétrade está orientada hacia el centro de la misma y se denomina cara proximal, y la que queda en el lado opuesto, es decir, dirigida hacia el exterior de la tétrade, es la cara distal. Ambas caras están separadas por la zona correspondiente al ecuador.

En el momento de la germinación, las esporas se abren gracias a la existencia de una abertura única o lesura, situada en la cara proximal.

Las esporas con simetría radial poseen una lesura trirradiada, formada por tres brazos convergentes en un punto; el polo proximal, que es el centro de la cara apertural, son las denominadas esporas triletas que, si se observan en vista polar, pueden presentar un contorno circular o más o menos triangular, como resultado de su forma general esférica o tetraédrica, respectivamente (Salvo Tierra, 1990).

Las esporas de Ciateaceas son típicamente triletas, con exina gruesa, no clorofílicas y permanecen viables por largo tiempo (Pérez y Riba, 1982).

g. Determinación de un método para diseñar medios de cultivo artificiales adecuados para la germinación de esporas de algunas especies de helechos arborescentes

Existen pocos estudios sobre la germinación por medio de esporas y crecimiento de especies de helechos arborescentes. Además, el crecimiento de helechos arborescentes en sus hábitats naturales ha sido pocas veces estudiado por el lento crecimiento o desarrollo de éstos y la necesidad de realizar observaciones por largos períodos de tiempo (Seiler, 1981).

Los helechos pueden reproducirse de dos maneras básicas:

- 1.- vegetativamente, de partes de la planta madre (rizomas, frondes) o
- 2.- sexualmente, por medio de esporas.

En este trabajo de investigación se estudió la forma en que se reproducen naturalmente en sus hábitats, por medio de propagación sexual. También el espacio y equipo requerido para reproducirlos por medio de esporas es mínimo.

h. Medios de cultivo

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, segmentos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, 1977).

El medio Murashige y Skoog(1962), (Ver apéndice 1), se usa generalmente en la iniciación de cultivos de helechos, en la preparación de las plantas obtenidas in vitro para su trasplante al suelo(Hurtado y Merino, 1987).

El cultivo de microesporas es importante en estudios de mutagénesis. Los haploides pueden permanecer genéticamente estables, siendo posible la regeneración de plantas diploides a partir de haploides(Deureux y Laneri, 1974).

II. OBJETIVOS

Dada la importancia de encontrar métodos para desarrollar el uso sustentable de los recursos naturales, en este estudio se pretende investigar la posibilidad de lograr la germinación de esporas y cultivo inicial de los helechos arborescentes en diferentes medios de cultivo artificiales estériles, con el objetivo de introducir estas técnicas en un sistema de producción de helechos arborescentes en el campo.

Hipótesis: Si se puede encontrar el medio adecuado para la germinación de esporas, es factible cultivar artificialmente las primeras fases de desarrollo de especies de helechos arborescentes de los géneros Cibotium, Dicksonia, Alsophila, Cyathea y Lophosoria.

Los objetivos del presente estudio son:

- A- Describir el ciclo de vida de los mismos géneros de helechos arborescentes, desde espora hasta esporofito.
- B- Diseñar medios de cultivos adecuados para el crecimiento y propagación de esporas, gametofitos y esporofitos de diferentes especies de helechos arborescentes.

III. METODOLOGIA

- 1.- Recolección de muestras frescas en el campo y selección de la planta madre. (Se recolectan pinnas o frondes, asegurándose que los frondes son fértiles y con esporangios maduros; se recolecta peciolo y rizomas para la clasificación). Se utilizaron frondes de las siguientes especies: Cibotium regale, Dicksonia gigantea, Alsophila salvinii, Cyathea tuerckheimii y Lophosoria quadripinnata.

Estas muestras fueron colectadas en Finca Lousiana, Cerro Miramundo; Chilasco, Baja Verapaz (Altitud:2000-2375m s.n.m.), Posada Quetzal, Baja Verapaz (Altitud:1800m s.n.m.), Sierra Yalijux, montaña Chelemhá, Alta Verapaz (Altitud:2100-2300m s.n.m.) y Universidad del Valle, Guatemala (Cibotium regale en forma ornamental dentro del campus) (Altitud:1510m s.n.m.).

- 2.- Colocar en bolsas plásticas transparentes debidamente etiquetadas (localidad, colector, fecha colecta, altitud).
 - 3.- En el laboratorio colocar los frondes o pinnas en papel periódico con esporangios hacia abajo para la liberación de esporas y dejarlas por 1-3 días a temperatura ambiente. Se colocaron luego esporas en bolsas de papel Kraft o encerado, debidamente etiquetadas.
- Se hicieron especímenes de herbario para referencia, se registraron con número de herbario e identificaron.

4.- Esterilización de esporas: Se probaron tres concentraciones distintas de soluciones de hipoclorito de sodio, preparadas de la siguiente manera:

- a) Se prepararon soluciones de cloro al 2 %, 10%, y 20 % por volumen, utilizando agua destilada-desionizada.
- b) Se agregaron las esporas a la solución pertinente de cloro.
- c) Se centrifugaron soluciones de cloro con las esporas por 15 minutos (4 RPM x 1000).
- d) Se recentrifugaron por 3 minutos las soluciones de cloro con las esporas.
- e) Se lavaron las esporas con agua destilada-desionizada, se filtró luego la solución y se colocaron en cajas Petri con papel filtro esterilizado hasta que se sembraron.

Sólo se esterilizaron esporas a trabajar en medio MS. En otros medios artificiales no se sugiere esterilización (Cortez, 1992).

5.- Preparación de medios de cultivo:

Los medios de cultivo que se probaron eran:

tierra-arena blanca (partes iguales)

tierra-arena blanca-nutriente (partes iguales)

arena blanca

arena blanca-nutriente

agar

agar líquido

broza

La arena y la tierra se esterilizaron con anterioridad (en horno a 180°C por 24 h), la broza también se esterilizó (en horno a 110°C por 24 h).

6.- Se prepararon las camaras de cultivo de la siguiente manera:

a) En cajas plásticas de camisa de 37.5 cm de largo y 27.5 cm de ancho y 13.5 cm de profundidad, debidamente esterilizadas (lavadas con jabón y luego con alcohol 2-propílico al 80 %) con tapa, se colocaron uno de los medios a probar.

b) Los medios tenían una profundidad de 4 cm.

c) En magentas plásticas de 6.2 cm de ancho y 9.9 cm de profundidad con tapa (lavadas con jabón) se colocó:

arena blanca

El medio tenía una profundidad de 2-2.5 cm.

Luego se colocaron las magentas con la arena blanca a esterilizar en autoclave(15 lbs psi) por 20 minutos a 120°C.

d) En magentas plásticas (lavadas con jabón) con tapa se colocó:

agar (Murashige y Skoog) (150 ml aprox.)

(Ver Apéndice 1)

Se esterilizó por 15 minutos en la autoclave (15 lbs psi).

7.- Se agregó a las magentas (exceptuando las con agar MS) 25 ml de y a las cajas de camisa un litro de:
agua destilada-desionizada o una solución de nutriente Peters 20-20-20 (urea, amonio, fosfato, nitrato de potasio) pH= 6, estéril y con una conductividad ajustada a 150 uohms con agua destilada-desionizada (Aprox. 1 cucharada en 3 galones de agua destilada-desionizada).

Se esperó hasta que el medio estaba uniformemente húmedo.

8.- Siembra de esporangios:

Se sembraron los esporangios de la siguiente manera:

- a) Esporas esterilizadas(0.4 g) en magentas con agar bajo campana de reflujo laminar(magenta-agar).
- b) Esporas esterilizadas(0.4 g) en magentas con arena bajo campana de reflujo laminar(magenta-arena).
- c) Esporas sin esterilizar(1 g) en cajas plásticas en lugar cerrado(caja:arena blanca), (caja:arena blanca-nutriente), (caja:tierra-arena blanca), (caja:tierra-arena blanca-nutriente), (caja:broza).
- d) Se realizó un conteo de esporas de helechos arborescentes con la ayuda de un microscopio para establecer aproximadamente cuántas de estas se sembraron en cada medio.

9.- Colocado en laboratorio:

- a) Se colocaron las magentas-agar en laboratorio con temperatura 20 °C , 16 horas luz.

Se colocaron magentas-arena y todas las cajas de camisa en laboratorio con temperatura 21-25 °C, 65 % humedad

relativa y 16 horas luz.

10.- Análisis de resultados de germinación de esporas:

Se hicieron semanalmente las anotaciones como detalla la hoja de datos en el apéndice 2.

- i) Contaminación presente o no.
- ii) Se humedeció con agua destilada desionizada los medios con arena blanca, arena blanca-nutriente, tierra-arena blanca, tierra-arena blanca-nutriente y broza, cuando fue necesario.
- iii) Fecha de germinación de esporas.
- iv) En caso de que hubo germinación, se observó y anotó fecha y características de las fases del ciclo de vida, tales como: prótalo, rizoides, primeras hojas y esporofito.
- v) Exito de germinación y crecimiento en los distintos medios.
 - a) En casos donde sólo germinó el prótalo y no siguió el desarrollo, se buscó medios apropiados para efectuar el traslado del prótalo y asegurar la continuación del ciclo de vida.
 - b) Al desarrollarse el esporofito se cambió de medio de cultivo (En macetas de aprox. 24 cm de profundidad se colocó mezcla aprox. de 19 cms de tierra-arena blanca-humus) y se trasladaron al campo, cuidando que hubieran condiciones favorables de temperatura y humedad como en el laboratorio.

- c) Se analizaron resultados observados en todos los medios, comparando número total de plantas que mayor éxito tuvieron en germinar en diferentes medios de cultivo artificiales.
- d) Se realizaron estudios fotomicroscópico y no microscópico de las diferentes etapas del ciclo de vida. Incluye descripción de esporas, esporangio, gametofito y esporofito para cada especie.
- e) Se realizó revisión taxonómica preliminar de las Familias Cyatheaceae y Dicksoniaceae en Guatemala.

IV. RESULTADOS

a. Tratamientos con medios de cultivo

ESTERILIZACION

En la Tabla 1 se indican los tres tratamientos que se realizaron con las esporas de las cinco especies de helechos arborescentes. Se utilizaron concentraciones de cloro al 2%, 10% y 20% (V/V). Sólo hubo germinación de esporas de la especie Cibotium regale en Agar con tratamiento con cloro al 10%.

En los medios de cultivo Agar y Agar líquido, hubo contaminación elevada con tratamientos con cloro al 2% y al 10%. La contaminación fue sólo por hongos. Con la solución con concentración de cloro al 20% no se observó contaminación ni germinación y se concluye que a esta concentración se perjudican las esporas.

TABLA 1: Porcentaje de contaminación en diferentes especies con tres tratamientos de Hipoclorito de Sodio en medio artificial, agar (MS) y agar líquido (MS)

ESPECIE	TRATAMIENTO PORCENTAJE POR VOLUMEN	PORCENTAJE DE CONTAMINACION
<i>Cibotium regale</i>	2	100
	10	0
	20	100
<i>Dicksonia gigantea</i>	2	100
	10	no germinaron
	20	no germinaron
<i>Alsophila salvinii</i>	2	100
	10	no germinaron
	20	no germinaron
<i>Cyathea tuerckheimii</i>	2	100
	10	no germinaron
	20	no germinaron
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	2	100
	10	no germinaron
	20	no germinaron

b. Helechos arborescentes y su germinación y desarrollo según medios de cultivo

En la Tabla 2 se observan los medios donde hubo germinación de esporas hasta desarrollo de gametofito y de gametofito hasta crecimiento de esporofito de las cinco especies de helechos arborescentes estudiadas.

Con la especie Cibotium regale hubo germinación de esporas en los medios de cultivo: agar y arena-nutriente, siendo más corto el tiempo de germinación de esporas a gametofito (16 días) en agar, que en arena-nutriente (7 meses). Sin embargo el tiempo requerido de gametofito para desarrollo de esporofito fue más corto en el medio de cultivo arena-nutriente (4 meses), que en agar (11 meses).

Las esporas de la especie Dicksonia gigantea germinaron en tierra-arena-nutriente y las esporas de la especie Alsophila salvinii germinaron en arena y arena-nutriente.

La especie que mayor éxito de germinación de esporas en diferentes medios tuvo fue Cyathea tuerckheimii.

Hubo germinación de esporas hasta desarrollo de esporofito en tierra-arena, arena-nutriente, tierra-arena-nutriente y arena.

Las esporas de la especie Lophosoria quadripinnata germinaron y crecieron hasta gametofito en el medio de cultivo tierra-arena.

También hubo desarrollo de gametofito a esporofito.

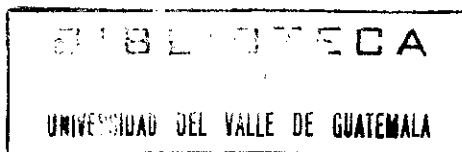


TABLA 2: Germinación de esporas arboreascentes y desarrollo, según medios de cultivo.

Localidad	Colector / fecha	# Herbario	Medio	Fecha (día, mes, año) - tiempo para desarrollar			
				Utilizado	Espora de esporas	Protalo Genetofito	Cambio a medio nuevo y Antheridios y Arqueogonios
UVG	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium regale</u>	agar	1/12/92	17/12/92 16 días	3/2/93 agar	Nov. 1993 11 meses
UVG	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium regale</u>	arena-nutriente	1/12/92	5/7/93 7 meses	-----	Nov. 1993 4 meses
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia gigantea</u>	tierra-arena-nutriente	5/4/93	1/9/93 5 meses	-----	Enero 1994 4 meses
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4575 <u>Aleophila salvinii</u>	arena-nutriente	5/4/93	17/7/93 3 meses y 12 días	-----	Enero 1994 3 meses
Valijux Alta, V.	J. Ruiz 17/5/94	4581 <u>Aleophila salvinii</u>	arena	25/5/94	20/8/94 3 meses	-----	Sept. 1994 1 mes
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4568 <u>Cyathea tuerckheimii</u>	tierra-arena	5/4/93	7/3/94 11 meses	-----	Junio 1994 14 meses
Posada Quetzal Baja, V.	M. Dix 13/3/93	4569 <u>Cyathea tuerckheimii</u>	arena-nutriente	5/4/93	15-20/7/93 3 meses	-----	Febrero 1994 7 meses
Posada Quetzal Baja, V.	M. Dix 13/3/93	4569 <u>Cyathea tuerckheimii</u>	tierra-arena-nutriente	5/4/93	7/6/93 2 meses	-----	15/12/93 6 meses
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4568 <u>Cyathea tuerckheimii</u>	arena	5/4/93	7/3/94 11 meses	-----	Junio 1994 3 meses
Posada Quetzal Baja, V.	M. Dix 13/3/93	4569 <u>Cyathea tuerckheimii</u>	arena	5/4/93	7/2/94 10 meses	-----	Abril 1994 2 meses
Posada Quetzal Baja, V.	M. Dix 13/3/93	4570 <u>Lophosoria quadripinnata</u>	tierra-arena	5/4/93	15/7/93 3 meses	-----	Oct. 1993 3 meses

27

En la Tabla 3 se indican los medios donde no hubo germinación de esporas con las cinco especies de helechos arborescentes. Los medios en los que no hubo germinación de alguna especie son agar líquido y broza de bosque nuboso. En estos medios es donde hubo mayor contaminación por hongo. Esta contaminación pudo inhibir o dañar a las esporas de los helechos arborescentes.

TABLA 3: Helichos procedentes de germinados

Localidad	Col. fecha	# herbario	medio	siembra	resultados
UVB	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium</u> <u>regale</u>	tierra arena nutriente	1/12/92	no germinaron
UVB	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium</u> <u>regale</u>	tierra arena	1/12/92	contaminación con hongo
UVB	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium</u> <u>regale</u>	arena	1/12/92	no germinaron
UVB	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium</u> <u>regale</u>	agar liquido	1/12/92	contaminación con hongo
UVB	J. Ruiz 27/11/92	4574 <u>Dibotium</u> <u>regale</u>	broza	1/12/92	contaminación con hongo
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia</u> <u>gigantea</u>	arena nutriente	5/4/93	no germinaron
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia</u> <u>gigantea</u>	tierra arena	5/4/93	no germinaron
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia</u> <u>gigantea</u>	arena	5/4/93	no germinaron
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia</u> <u>gigantea</u>	agar	2/7/93	contaminación con hongo
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia</u> <u>gigantea</u>	agar liquido	2/7/93	contaminación con hongo
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4571 <u>Dicksonia</u> <u>gigantea</u>	broza	5/4/93	contaminación con hongo
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4575 <u>Aiscophila</u> <u>salvinii</u>	tierra arena nutriente	5/4/93	no germinaron
Fca. Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4575 <u>Aiscophila</u> <u>salvinii</u>	tierra arena	5/4/93	no germinaron

TABLA 3: (Continuación)

Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4575 <u>Alsophila</u> <u>salvini</u>	agar	3/4/93	contaminación con hongo
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4575 <u>Alsophila</u> <u>salvini</u>	agar liquido	5/4/93	contaminación con hongo
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3.3/93	4575 <u>Alsophila</u> <u>salvini</u>	broza	3-4/93	contaminación con hongo
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4567 <u>Cyathea</u> <u>tuerckheimii</u>	broza	3/4/93	contaminación con hongo
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4568 <u>Cyathea</u> <u>tuerckheimii</u>	agar liquido	2/7/93	contaminación con hongo
Finca Lou- siana Baja Verapaz	M. Dix 3/3/93	4568 <u>Cyathea</u> <u>tuerckheimii</u>	agar	10/3/93	no germinaron
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4570 <u>Lopho-</u> <u>soria qua-</u> <u>dripinnata</u>	agar	25/3/93	no germinaron
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4570 <u>Lopho-</u> <u>soria qua-</u> <u>dripinnata</u>	agar liquido	25/3/93	contaminación con hongo
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4570 <u>Lopho-</u> <u>soria qua-</u> <u>dripinnata</u>	arena nutriente	25/3/93	no germinaron
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4570 <u>Lopho-</u> <u>soria qua-</u> <u>dripinnata</u>	tierra arena nutriente	25/3/93	no germinaron
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4575 <u>Lopho-</u> <u>soria qua-</u> <u>dripinnata</u>	arena	25/3/93	no germinaron
Posada Baja Verapaz	M. Dix 13/3/93	4575 <u>Lopho-</u> <u>soria qua-</u> <u>dripinnata</u>	broza	25/3/93	contaminación con hongo

NOTA: En hojas de datos de la Tabla 2 y la Tabla 3, el número de herbario es el número de registro para ubicación como material de referencia en el herbario de las cinco especies de helechos arborescentes. Se indica las fechas en que se sembraron esporas y fechas en que se observó germinación de gametofito y desarrollo de esporofito en los diferentes medios artificiales utilizados.

En la Tabla 4 se indican el número total de plantas germinadas hasta desarrollo de esporofito en cada uno de los medios artificiales de cultivo probados para cada especie. Se nota que la especie que mayor éxito en germinación de esporas es Cyathea tuerckheimii, ya que germinaron un total de 52 plantas en cuatro medios de cultivo (tierra-arena-nutriente, arena-nutriente, tierra-arena y arena). También se observa que en los medios que contenía nutriente es donde se logró mayor número de plantas germinadas (tierra-arena-nutriente y arena-nutriente). La especie que menos éxito en germinación de esporas hasta crecimiento de esporofito fue Lophosoria quadripinnata (2 plantas).

Los medios donde hubo mayor contaminación por hongos y donde no hubo crecimiento de esporofito son agar líquido y broza.

TABLA 4: Número de plantas que desarrollaron hasta esporofito en diferentes medios de cultivo

Especie	tierra-arena nutriente	arena-nutriente	tierra-arena	arena	agar	agar liquido	broza
<i>Cibotium regale</i>	0	14	0	0	4	0	0
<i>Dicksonia gigantea</i>	15	0	0	0	0	0	0
<i>Alsophila salvinii</i>	0	8	0	5	0	0	0
<i>Cyathea tuerckheimii</i>	21	4	20	7	0	0	0
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	0	0	2	0	0	0	0

En la Tabla 5 se indican las fechas de colecta, de siembra de las esporas, germinación de gametofito y germinación de gametofito hasta crecimiento de esporofito para cada especie de helecho arborescente estudiado en los diferentes medios de cultivo artificiales donde si hubo crecimiento de esporofito. Este tiempo varió en cada especie. Los meses de colecta de las esporas fue entre Noviembre(1992) y Abril(1993).

TABLA 5: Fechas de colecta, siembra y éxito en la germinación de gametofito hasta desarrollo de esporofito en diferentes medios de cultivo artificiales.

MEDIO	COLECTA	SIEMBRA	GAMETOFITO	ESPOROFITO
a) <i>Cibotium regale</i> (dd.mm.aa)				
agar	27/11/92	1/12/92	17/12/92	/11/93
arena-nutriente	27/11/92	1/12/92	5/7/93	/12/93
b) <i>Dicksonia gigantea</i>				
tierra-arena nutriente	3/3/93	5/4/93	1/9/93	/1/94
c) <i>Alsophila salvinii</i>				
arena-nutriente	3/3/93	5/4/93	17/7/93	/1/94
arena	17/5/94	25/5/94	20/8/94	/9/94
d) <i>Cyathea tuerckheimii</i>				
tierra-arena	3/3/93	5/4/93	/3/94	/6/94
arena-nutriente	13/3/93	5/4/93	15/7/93	/2/94
tierra-arena-nutriente	13/3/93	5/4/93	/6/93	15/12/93
arena	3/3/93	5/4/93	/3/93	/6/94
arena	13/3/93	5/4/93	/2/94	/4/94
e) <i>Lophosoria quadripinnata</i>				
tierra- arena	13/3/93	5/4/93	15/7/93	/10/93

NOTA: Las fechas de la tabla 5 son las que corresponden a la germinación de esporas hasta desarrollo de esporofito en diferentes medios de cultivo artificiales.

En la Tabla 6 se comparan los meses de germinación de esporas hasta crecimiento de gametofito y desarrollo de esporofito para cada especie de helecho arborescente en los diferentes medios de cultivo. La especie que menos tiempo requirió para que hubiera germinación de gametofito fue Cibotium regale con sólo 16 días. Con Dicksonia gigantea el tiempo hasta germinación de gametofito fueron 5 meses (Tabla 6b). Con Alsophila salvinii (Tabla 6c) el tiempo hasta germinación de gametofito fueron 3 meses. Con Cyathea tuerckheimii (Tabla 6d) los medios donde hubo mayor éxito en germinación de esporas hasta gametofito fueron en tierra-arena-nutriente y arena-nutriente, donde el promedio de tiempo fueron dos meses y medio, mientras que en los medios donde no se aplicó nutriente por ejemplo arena y tierra-arena el promedio de tiempo hasta germinación de gametofito fueron diez meses y medio. Con Lophosoria quadripinnata el tiempo hasta germinación de gametofito fueron 3 meses y 10 días.

Con Cibotium regale (Tabla 6a) el tiempo promedio total de desarrollo de esporofito en agar y arena-nutriente fueron 11 meses y con Dicksonia gigantea 9 meses en tierra-arena-nutriente. Con Alsophila salvinii (Tabla 6c) el tiempo total promedio fueron 7 meses en los medios arena-nutriente y arena. Se observa que con la especie Cyathea tuerckheimii (Tabla 6d) el tiempo total promedio requerido para crecimiento de esporofito estuvo entre los 11 meses. El medio que fue el más adecuado para un desarrollo de plantas de esta especie fue tierra-arena-nutriente. Con la especie Lophosoria quadripinnata (Tabla 6e) el tiempo total requerido para crecimiento de esporofito fueron 6 meses en tierra-arena.

TABLA 6: Comparación en meses y días desde fecha de siembra de esporas hasta desarrollo de esporofito

MEDIO	SIEMBRA	A GERMINACIÓN DE GAMETOFITO	DE GAMETOFITO A ESPOROFITO	TOTAL
a) <i>Cibotium regale</i>				
Agar	01/12/92	16 días	11 meses	11 meses 16 días
Arena-nutriente	01/12/92	7 meses	4 meses	11 meses
b) <i>Dicksonia gigantea</i>				
Tierra- arena-nutriente	05/04/93	5 meses 4 días	4 meses	9 meses 4 días
c) <i>Alsophila salvinii</i>				
Arena-nutriente	05/04/93	3 meses 12 días	6 meses	9 meses 12 días
Arena	25/05/94	3 meses 5 días	1 mes	4 meses 5 días
Promedio		3 meses	3.5 meses	6.5 meses
d) <i>Cyathea tuerckheimii</i>				
Tierra-arena	05/04/93	11 meses	3 meses	14 meses
Arena-nutriente	05/04/93	3 meses 10 días	7 meses	10 meses 10 días
Tierra-arena-nutriente	05/04/93	2 meses	6 meses	8 meses
Arena	05/04/93	11 meses	3 meses	14 meses
Arena	05/04/93	10 meses	2 meses	12 meses
Promedio		7 meses	4 meses	11 meses
e) <i>Lophosoria quadripinnata</i>				
Tierra-arena	05/04/93	3 meses 10 días	3 meses	6 meses 10 días

NOTA: Comparación en meses y días para cada especie que tuvo éxito en la propagación desde siembra de esporas hasta formación de gametofito y desarrollo de esporofito en los diferentes medios de cultivo artificiales.

En la Tabla 7 se comparan el número de pruebas donde hubo germinación de esporas hasta esporofito para cada especie para observar que especie tuvo mayor éxito reproductivo y de propagación. Se nota que la especie Cyathea tuerckheimii es la que tuvo mayor éxito de reproducción ya que de siete medios de cultivo que se probaron, ésta germinó en 4 diferentes medios.

En la Tabla 8 se describen las esporas de cada una de las cinco especies de helechos arborescentes estudiados. Se observa que las esporas de las cinco especies son típicamente triletes y de forma triangular y subtriangular.

A continuación se muestran ilustraciones de esporas, esporangio, gametofito y esporofito de estos helechos arborescentes.

En la lámina 1 se observan las esporas y esporangios de las especies Cibotium regale y Dicksonia gigantea.

En la lámina 2 se observan las esporas y esporangios de las especies Alsophila salvinii, Cyathea tuerckheimii y Lophosoria quadripinnata.

En la lámina 3 se observan gametofito y esporofito de las especies Cibotium regale y Dicksonia gigantea.

En la lámina 4 se observan gametofito y esporofito de las especies Alsophila salvinii, Cyathea tuerckheimii y Lophosoria quadripinnata.

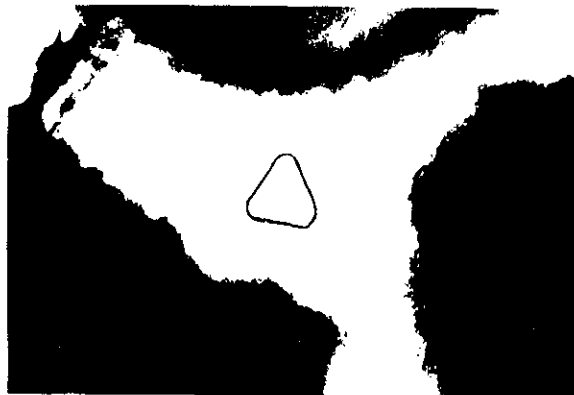
TABLA 7: Número de pruebas donde hubo germinación de esporas hasta esporofito para cada especie

ESPECIE	NUMERO DE PRUEBAS REALIZADAS	NUMERO DE PRUEBAS CON GERMINACION HASTA ESPOROFITO
<i>Cibotium regale</i>	7	2
<i>Dicksonia gigantea</i>	7	1
<i>Alsophila salvinii</i>	7	2
<i>Cyathea tuerckheimii</i>	7	4
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	7	1

TABLA 8: Descripción de esporas de diferentes especies de helechos arborescentes

ESPECIE	DESCRIPCION DE ESPORAS
<i>Cibotium regale</i>	Esporas tetraedricas, triletes, triangular con lesura trirradiada. Lámina 1
<i>Dicksonia gigantea</i>	Esporas triletes, triangular. Lámina 1
<i>Alsophila salvinii</i>	Esporas triletes, triangular. Lámina 2
<i>Cyathea tuerckheimii</i>	Esporas triletes, triangular. Lámina 2
<i>Lophosoria quadripinnata</i>	Esporas triletes, subtriangular. Lámina 2

c. Ilustraciones de esporas, esporangios, gametofito y esporofito de 5 especies de helechos arborescentes



Tamaño real: 0.4 mm

1



Tamaño real: 2.4 mm

2



Tamaño real: 0.5 mm

3



Tamaño real: 1.4 mm

4

ESCALA 250X

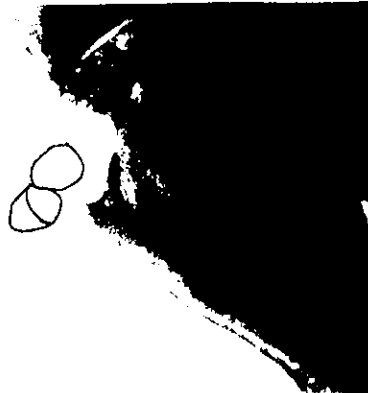
LAMINA 1: DICKSONIACEAE. Esporas. 1- Cibotium regale 3- Dicksonia gigantea Esporangios. 2- Cibotium regale 4- Dicksonia gigantea



Tamaño real: 0.5 mm
5



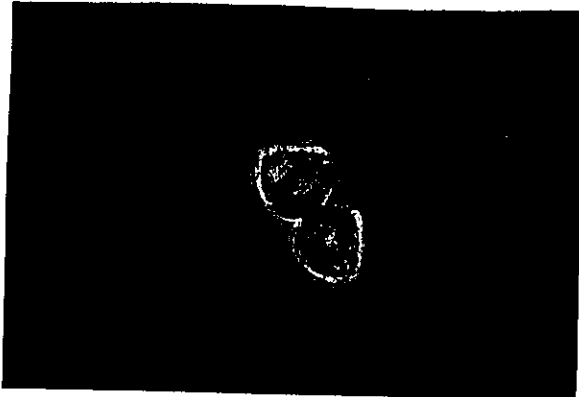
Tamaño real: 1.9 mm
6



Tamaño real: 0.3 mm
7



Tamaño real: 2.8 mm
8



Tamaño real: 0.5 mm
9



Tamaño real: 2.4 mm
10

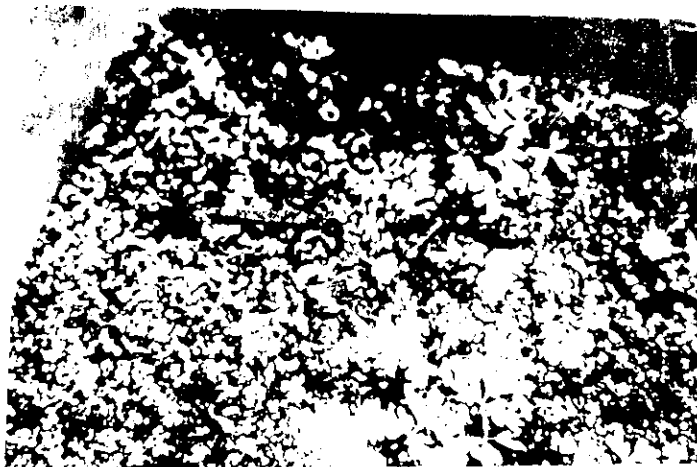
ESCALA 250 X

LAMINA 2. CYATHEACEAE. Esporas. 5- Alsophila salvinii 7- Cyathea tuerckheimii 9- Lophosoria quadripinnata
Eสปorangios. 6- Alsophila salvinii 8- Cyathea tuerckheimii 10- Lophosoria quadripinnata



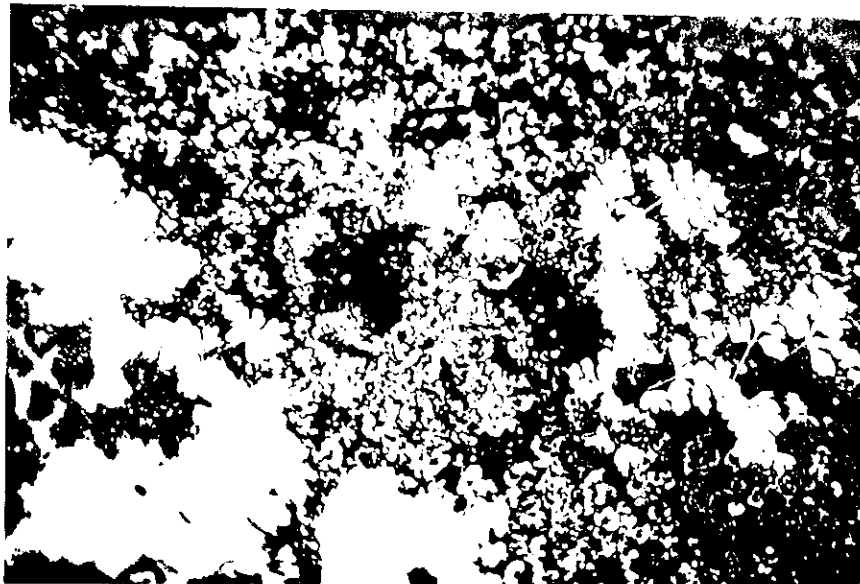
Tamaño real: 5 cm
1

e= esporofito
g= gametofito

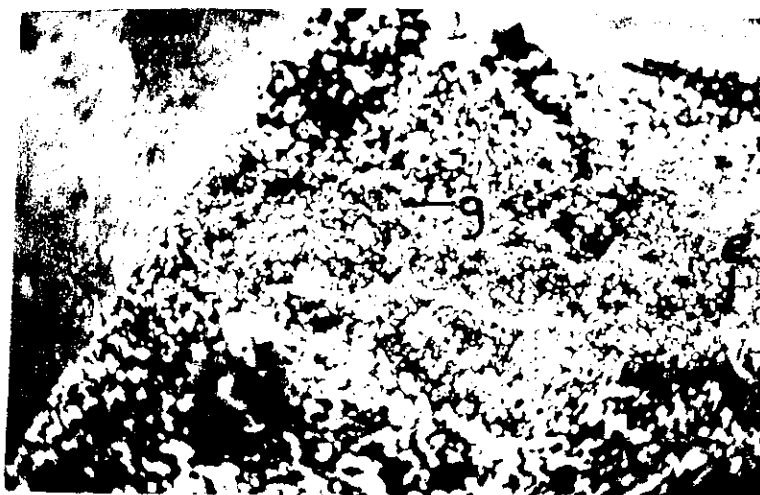


Tamaño real: 6 cm
2

LAMINA 3: DICKSONIACEAE. Gametofito y esporofito. 1- Cibotium regale 2- Dicksonia gigantea

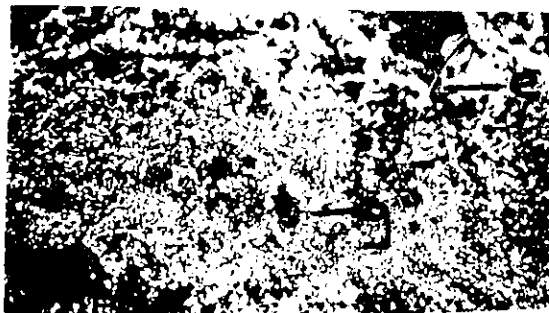


Tamaño real: 7 cm
3



e=esporofito
g=gametofito

Tamaño real: 2 cm
4



Tamaño real: 3 cm
5

LAMINA 4: CYATHEACEAE. Gametofito y esporofito. 3- Alsophila salvinii 4- Cyathea tuerckheimii 5- Lophosoria quadripinnata

Stolze (1976), agrupa en la Flora de Guatemala a 16 especies en la Familia Cyatheaceae y a 2 especies en la Familia Dicksoniaceae. Mickel y Beitel (1988), en la Flora de Oaxaca tratan la clasificación de los helechos arborescentes en un amplio sentido desde que se observaron repetición de características entre los grupos como tricomas, escamas, estructura del soro y esporangio, hábito del tronco y agrupan taxonómicamente a Alsophila, algunas especies de Nephelea, Sphaeropteris y Trichipteris en el género Cyathea.

Se consideró conveniente por lo tanto hacer una revisión taxonómica preliminar más adecuada a las características que se consideran para una mejor clasificación.

Se consultaron también las siguientes obras: Barrington(1978), Lellinger(1987), Lellinger(1989), Smith(1981) y Stolze(1976).

En la siguiente lista se da el nombre científico actual de los helechos arborescentes seguido por el nombre científico usado en Stolze (1976).

Familia Cyatheaceae:

Cyathea bicrenata Liebm., Mexic. bregn. 289 (sers.137).1849. (Trichipteris bicrenata (Liebm.) Tryon y Trichipteris pansamalana (Maxon) Tryon. Contrib. Gray. Herb. 200:44.1970).

Cyathea costaricensis (Klotzch ex Kuhn) Domin, Acta Bot. Bohem. 9:107. 1930. (Trichipteris costaricensis (Kuhn) Barr.) Cyathea divergens Kunze var. tuerckheimii (Maxon) Tryon, Contr. Gray. Herb. 206:56.1976. (Cyathea tuerckheimii Maxon) Cerro Miramundo, Chilasco, Baja Verapaz, Guatemala. 2375 m s.n.m. 5/IV/1993. Dix #10949 (UVG Reg. 4568)

Fam. Dicksoniaceae:

Cibotium regale Versch. & Lem., Ill. Hort. 15:t.548. 1868. UVG, Guatemala, Guatemala. 1510 m s.n.m. 1/XII/1992. Ruiz s.n. (UVG Reg. 4574).

Dicksonia gigantea Karst., Fl. Columb. 2:177,pl.193. 1869. Cerro Miramundo, Chilasco, Baja Verapaz, Guatemala. 2375 m s.n.m. 5/IV/1993. Dix #10952 (UVG Reg. 4571).

e. Conteo de esporas

Se realizó un conteo de esporas para establecer aproximadamente cuantas esporas se sembraron en cada medio de cultivo. Se sembró 1 g de esporas en las cajas de camisa plásticas y se calculó que hay 968,000 esporas. En 0.4 g de esporas sembradas en magentas plásticas se calculó habían 387,000 esporas.

V. DISCUSION

a. Esterilización

Como se observa en la Tabla 1, hubo contaminación elevada con tratamientos con cloro al 2 % y al 10%. La contaminación fue sólo por hongos. Esto se puede deber a que los tratamientos no fueron los adecuados para las especies de hongos presentes o la cantidad de esporas de hongos presentes era muy alta.

El material a trabajar en medios MS tiene que estar completamente estéril ya que este medio es muy nutritivo y apto para que proliferen hongos y bacterias.

Se sugiere utilizar concentraciones entre 5% y 10% (V/V) de cloro comercial (5.25 % NaOCl) y agitar de 2 a 10 minutos para lograr mayor éxito en la germinación de esporas de helechos arborescentes.

b. Colecta de esporas

Los esporangios están agrupados en soros y se encuentran localizados en la parte inferior del fronde. Algunos helechos producen esporas todo el año y otros son estacionales.

Durante la época de invierno no hay producción ni liberación de esporas, entonces se colectaron frondes entre los meses de Noviembre y Abril.

Es muy fácil que se contaminen con esporas de otras especies y son muy susceptibles a perder la viabilidad por cambios de humedad y otros factores ambientales aún desconocidos.

c. Medios de cultivo

Se realizaron mezclas ya que se buscaba lograr un alto porcentaje de germinación de esporas y mayor éxito de desarrollo de las cinco especies de helechos arborescentes estudiados.

Se probó también con agar nutritivo Murashige y Skoog líquido y sólido (Apéndice 1). Esta técnica es muy utilizada para propósitos científicos o cuando las esporas son muy valiosas y las técnicas de esterilización son necesarias para asegurar su supervivencia.

Los helechos arborescentes crecen en muchos tipos de suelos ya sea sustratos ácidos de tierra negra y arcilla, suelos con mucha materia orgánica, etc. Prefieren mucha humedad especialmente durante la fase de desarrollo.

Se utilizó broza (pH= 5.0) y tierra (pH= 6.0) debido a que producen un medio ácido, preferido por los helechos arborescentes, y son buenos absorbentes de la humedad. La arena es de grano grueso (pH= 6.0) y proporciona aereación a los medios de cultivo.

El medio de cultivo menos adecuado para la germinación de esporas fue el de broza de bosque nuboso (Ver Tabla 4) ya que se contaminaron todos los medios con hongo y esto pudo inhibir o dañar a las esporas. Por ser broza de bosque nuboso con gran cantidad de microorganismos, a pesar de haberse esterilizado en horno por 24 horas antes de sembrar las esporas de los helechos, posiblemente no se logró la completa esterilización o posiblemente por no haberse esterilizado las esporas de los helechos se presta a que haya proliferación de esporas de hongos que pudieron estar mezcladas con éstas. Se esperaba que por ser el sustrato que se encuentra presente en hábitats de los

helechos arborescentes, fuese el que mejor resultado daría para la germinación de las esporas de éstos.

El medio de cultivo que resultó ser el más apropiado (Ver Tabla 4) fue el de tierra-arena-nutriente. En este medio germinaron 15 plántulas de la especie Dicksonia gigantea y 21 plántulas de la especie Cyathea tuerckheimii. Se puede concluir que debido a que existía muy buena humedad y aereación y suficientes nutrientes fue posible que germinaran mejor mayor número de esporas.

d. Esporas y Germinación

El tiempo en que las esporas permanecen viables desde que se colectan varia de especie a especie (Ver Tabla 6). Pero mientras más frescas son las esporas, más alto y más rápido será el porcentaje de germinación. La especie Cibotium regale tuvo un rango de germinación de 16 días, Dicksonia gigantea 5 meses y 4 días, Alsophila salvinii 3 meses, Cyathea tuerckheimii 7 meses y Lophosoria quadripinnata 3 meses y 10 días.

Cómo se explicó anteriormente en el caso de Cibotium regale los nutrientes del medio (agar MS) pudieron favorecer la germinación de las esporas en tan corto tiempo, así como también el porcentaje de humedad puede ser el óptimo para la germinación de éstas.

Hay que tomar en cuenta que no se sabe los estímulos naturales que inician el proceso de liberación de esporas en la naturaleza; tampoco se puede controlar el tiempo que pueden quedar expuestas las esporas antes de su liberación y cual es el porcentaje de humedad necesario para que haya liberación de esporas. Sin embargo los trabajos de Pérez y Riba (1982) demuestran que hay diferencias marcadas en la germinación según

la temperatura y que la germinación se reduce grandemente arriba de los 25°C.

En el presente trabajo se mantuvo la temperatura entre los 21-25 °C, la cual parece ser óptima.

Los helechos como Cibotium regale, Dicksonia gigantea, Alsophila salvinii, Cyathea tuerckheimii y Lophosoria quadripinnata, que no poseen esporas clorofílicas generalmente tienen un período de viabilidad más largo. Aunque varía de especie a especie, sin embargo, esporas colectadas y almacenadas correctamente retendrán su viabilidad entre 3-5 años o talvés más (Jones, 1987).

Las esporas de las Fam. Dicksoniaceae y Cyatheaceae son comúnmente no clorofílicas. El más alto porcentaje de germinación se obtiene de esporas producidas durante períodos de crecimiento vigoroso. Las esporas no clorofílicas requieren períodos de germinación más largos. Se sabe que si las esporas o absorben agua y no germinan los productos de almacenamiento son reducidos y la espora se torna no viable. Las esporas no clorofílicas contienen niveles altos de lípidos, grasas y proteínas. Sin embargo, muchas absorben agua adicional y producen cloroplastidios de protoplastidios antes de germinar (Lloyd y Klekowski, 1970).

La especie que mayor éxito en germinar tuvo en los diferentes medios fue Cyathea tuerckheimii (Ver Tabla 4). Esta germinó en cuatro de los siete medios probados. También fue la especie que mayor número de plántulas produjo (Ver Gráfica 6), con 52 plántulas germinadas. Esta especie es sumamente común en la regeneración natural de bosques aunque también es frecuente en bosques maduros, bosques nubosos y en lados claros de bosques

(Stolze, 1976). Es la especie dominante en los claros del bosque nuboso en la Sierra de las Minas. Este podría ser un factor que favoreciera a la alta germinación en los diferentes medios artificiales ya que es adaptable a diferentes sustratos.

Cibotium regale es muy común como helecho ornamental y adaptable a diferentes sustratos, aunque necesita mucha humedad y sustratos preferiblemente ácidos. En este caso germinaron 18 plántulas, una cifra alta en comparación con las demás especies (Ver Gráfica 6).

Las especies, Dicksonia gigantea y Lophosoria quadripinnata, son las que menos éxito en germinar tuvieron. Estas especies son poco comunes en los bosques pluviales montano bajo y necesitan mucha humedad y sombra.

En la Tabla 6 se observa que el tiempo de germinación de las esporas desde la siembra hasta la formación del gametofito fue diferente entre todas las especies. El promedio de tiempo fue 3 meses. El tiempo de germinación hasta esporofito para todas las especies estuvo entre los 4 meses y los 14 meses, con un promedio de tiempo de 8 meses y medio.

Las Gráficas 1-5 representan el tiempo de germinación desde siembra hasta esporofito de las diferentes especies en los diferentes medios de cultivo artificiales. Se concluye que en los medios que contenían nutriente Peters se vio favorecida la germinación de las esporas.

Los problemas que se tienen en germinación de esporas son:

- Esporas infértiles. Esto se puede deber a que cuando se colectan están inmaduras o infértiles.
- Mal almacenamiento de éstas lo que provoca daño.
- Que sean producidas de plantas híbridas.

Mickel y Beitel(1988), en la Flora de Oaxaca mencionan que la extensa hibridización entre los grupos de helechos arborescentes incluyendo diploides fértiles, hace su reconocimiento como géneros, extremadamente tenue. Lellinger(1987) menciona que ocurre hibridización dentro de Alsophila y Cyathea y entre Cnemidaria y Cyathea y que es una evidencia del alto grado de relación que existe con Sphaeropteris.

Generalmente sólo helechos arborescentes estrechamente relacionados pueden producir híbridos y la progenie es usualmente estéril(Jones, 1987). Sin embargo, Conant y Cooper-Driver(1980) describen híbridos fértiles diploides entre dos especies de Alsophila y una de Nephelea en Puerto Rico.

- Contaminación por medio de algas, hongos, musgos, líquenes y plantas creciendo sobre los frondes.
- Temperatura, luz y humedad incorrecta en el laboratorio donde se tienen los medios de cultivo artificiales.
- Al sembrar muchas esporas puede ocurrir amontonamiento en el crecimiento de los prótalos. Estos se vuelven susceptibles a daños, como por ejemplo a las gotas de condensación que se forman en las cajas de cultivo y a la entrada de plagas también. Otro problema es que prótalos amontonados producen principalmente anteridios y pocos arquegonios y por lo tanto se impide la fertilización entre éstos(Jones, 1987).

Se sugiere utilizar fungicida antes de la siembra de las esporas en los diferentes medios de cultivo para evitar de esta forma la germinación de esporas de hongos y evitar que el medio se contamine e inhiba la germinación de las esporas de los helechos, asumiendo que el fungicida no va a inhibir la germinación de las esporas de los helechos arborescentes.

Las cinco especies de helechos arborescentes estudiados tienen esporas triletes y de forma triangular. Cibotium regale es la única especie con lesura en la estructura de las esporas. En este caso la lesura es trirradiada. Es interesante ya que esta fue la especie que germinó en menos tiempo (Ver Tabla 6a). Es posible que la presencia de una lesura favorezca a que germinen más rápidamente las esporas, sin embargo se necesita más experimentación.

Se realizó un conteo de esporas para establecer aproximadamente cuantas esporas se sembraron en cada medio de cultivo. El porcentaje de germinación fue mínimo ya que en los medios donde se agregó 1 g de esporas se calculó habían 968,000 esporas y en los que se agregó 0.4 g de esporas se calculó habían 387,000 esporas.

En este trabajo se demuestra que en el laboratorio el poder germinativo de las esporas de los helechos arborescentes aparenta ser muy reducido lo que sugiere que podría ser así en la naturaleza, que de millares de esporas que son liberadas, pocas son las que llegan a germinar. Para su germinación y desarrollo hasta esporofitos requieren sustratos adecuados, humedad, nutrientes del suelo, sombra y protección por otras plantas. Esto nos indica que es indispensable proteger los hábitats donde actualmente todavía podemos encontrar helechos arborescentes, así como también a estas especies de helechos arborescentes para evitar su extinción.

Hay que tomar en cuenta la distribución altitudinal de las especies de helechos arborescentes. En Guatemala los podemos encontrar en altitudes desde el nivel del mar hasta 3800 m s.n.m.

La mayoría de las especies de helechos arborescentes (10 de las 18 especies en Guatemala) las podemos encontrar en el rango de 800 m s.n.m. hasta 3800 m s.n.m., como por ejemplo Alsophila salvinii, Cyathea tuerckheimii, y Lophosoria quadripinnata.

En Stolze(1976) se agrupan los helechos arborescentes de Guatemala en 8 géneros (Alsophila, Cyathea, Lophosoria, Nephelea, Sphaeropteris, Trichipteris, Cibotium y Dicksonia) con 18 especies. Según la literatura más reciente, por ejemplo Mickel y Beitel(1988), a éstos los agrupan en 5 géneros (Cyathea, Lophosoria, Nephelea, Cibotium y Dicksonia) con 18 especies. Esto se debe a que se ha observado repetición de características entre los grupos, entre éstas, forma de escamas y tricomas, pelos distintivos, hábito del tronco, estructura de esporangios y soros, etc, lo que sugirió la necesidad de revisiones taxonómicas.

En este trabajo de investigación se demuestra que los helechos arborescentes necesitan un largo período de tiempo para que logren germinar sus esporas hasta desarrollo de esporofito (aproximadamente 3 años o más para llegar hasta esporofito y para que el mismo esporofito logre producir esporas viables entre 5 y 10 años). Falta información sólida sobre el tiempo de crecimiento y edad de madurez de los helechos arborescentes en el campo. Esto resalta la importancia de hacer investigación de campo.

Se puede concluir que trabajar con medios de cultivo artificiales para la propagación de esporas de helechos arborescentes no es un trabajo fácil y se necesita de más estudios antes de que estos medios de propagación sean una posibilidad real para el uso sustentable de los helechos arborescentes de Guatemala.

VI. CONCLUSIONES

- Es factible cultivar artificialmente las primeras fases de desarrollo de especies de helechos arborescentes, pero para lograr el uso sustentable de éstos se necesita de más investigación.
- La desinfección con cloro comercial al 20% V/V (5.25% NaOCl) inhibe la germinación de esporas de helechos arborescentes.
- Se logra mayor éxito de germinación de esporas de helechos arborescentes en medios de cultivo que se humedecen con nutriente Peters 20-20-20 que en los que se humedecen con agua destilada-desionizada.
- Para lograr la germinación de esporas de helechos arborescentes y desarrollo hasta esporofito se requiere de sustratos, humedad, nutrientes y sombra adecuados.
- Es necesario proteger los hábitats naturales de helechos arborescentes así como a estas especies para evitar su extinción.

VII. RECOMENDACIONES

- Utilizar concentraciones de cloro comercial (5.25% NaOCl) entre 5 y 10% V/V y agitar manualmente entre 2 y 7 minutos para la esterilización de las esporas de helechos arborescentes antes de sembrarlas en los medios de cultivo.
- Esterilizar broza en horno a 180 °C por 24 h.
- Probar otras mezclas para medios de cultivo como: arena blanca-broza y tierra-broza.
- Utilizar fungicida que no inhiba la germinación de esporas de helechos arborescentes antes de la siembra de éstas en medios de cultivo.
- En caso de amontonamiento en crecimiento de prótalos, separarlos y cambiar a nuevos medios de cultivo.
- Cambiar plántulas esporofíticas a nuevos medios de cultivo como: tierra-arena blanca-humus y trasladar a campo o invernadero cuidando condiciones de humedad, temperatura y sombra.

VII. LITERATURA CITADA

- Barrington, D.S. 1978. A revision of Trichipteris. Contr. Gray.Herb. 208: 1-93.
- Conant, D.S., G. Cooper-Driver. 1980. Autogamous allohomoploidy in Alsophila and Nephelea (Cyatheaceae): A new hypothesis for speciation in homoploid homosporous ferns. Amer. Jour. Bot.67: 1269-1288.
- Cortez, M. 1992. Reproducción de helechos arborescentes por medio de esporas. Pankia. Boletín Informativo, Asociación Jardín Botánico La Laguna, El Salvador. 4: 3-4 .
- Deureux, M. y V. Laneri. 1974. Anther culture, haploid plant, isogenic line and breeding researches in Nicotiana tabacum L. En Hurtado, D. y M. E. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas, México, D. F. 232 p.
- Fuller, H., Z. Carothers, W. Payne y M. Balbach. 1974. Botánica. 5ta ed. Interamericana, México, D. F. 512 p.
- Hurtado, D. y M. E. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas, México, D. F. 232 p.
- Jones, D. 1987. Encyclopedia of Ferns. Vol1. Timber Press Inc, Oregon, USA. 350 p.

- Lellinger, D.B. 1987. The disposition of Trichopteris (Cyatheaceae). American Fern Journal 77(3):90-94.
- Lellinger, D.B. 1989. The ferns and fern allies of Costa Rica, Panamá and the Chocó. (Part 1: Psilotaceae through Dicksoniaceae). Pteridologia 2A. 364 p.
- Lloyd, R. y E. Klekowski. 1970. Spore germination and , viability in pteridophyta:evolutionary significance of chlorophyllous spores. Biotropica 2(2): 129-137.
- Mickel, J. y J. Beitel. 1988. Pteridophyte Flora of Oaxaca, Mexico. Memoirs of the New York Botanical Garden 46: 1-568.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Organismo Legislativo. Congreso de la República de Guatemala. 1988. Decreto No. 65-88. Artículo 2.
- Perez, B., y R. Riba. 1982. Germinación de esporas de Cyatheaceae bajo diversas temperaturas. Biotropica 14(4): 281-287.

- Salvo Tierra, E. 1990. Guia de Helechos de la Península Ibérica y Baleares. Ed. Pirámide S.A. Madrid. 377p.
- Seiler, R. 1981. Leaf turnover rates and natural history of the Central American tree fern, Alsophila salvinii. American Fern Journal 71(3): 75-81.
- Smith, A.R. 1981. En D.E. Breedlove, Flora of Chiapas. Part 2. Pteridophytes. 370 p.
- Stolze, R. G. 1976. Flora of Guatemala. Ferns and Fern Allies of Guatemala. Part I. Ophioglossaceae through Cyatheaceae. Fieldiana Bot. 39: 1-130. p.
- Street, H. E. 1977. Plant tissue and cell culture. En Hurtado, D. y M.E. Merino. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas, México, D. F. 232 p.
- Villee, C., E. P. Solomon y P. W. Davis. 1987. El Fascinante Mundo de la Biología. Interamericana, MacGraw-Hill, México. 678 p.

APENDICE 1.

Medio de Murashige y Skoog para el cultivo de esporas:

-Solución Stock de Macroelementos MS	g/l
Nitrato de amonio	16.5
Nitrato de potasio	19.0
Cloruro de calcio dihidratado	4.4
Sulfato de magnesio heptahidratado	3.7
Fosfato de monopotasio	1.7

Agregar estas cantidades en un balón de 1000 ml con 500 ml de agua destilada, mezclar bien hasta que estén bien disueltas, completar el volumen con agua destilada.

Utilizar 100 ml de esta solución para preparar un litro de medio.

-Solución Stock de Microelementos MS

	g/l
Sulfato de manganeso tetrahidratado	2.23
Acido Borico	0.62
Sulfato de zinc heptahidratado	0.86
Ioduro de potasio	0.083
Molibdato de sodio dihidratado	0.025
Sulfato de cobre pentahidratado	0.0025
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0025

Agregar estas cantidades en un balón de 1000 ml con 500 ml de agua destilada, mezclar bien hasta que estén bien disueltas, completar el volumen con agua destilada. Utilizar 10 ml de esta solución para preparar un litro de medio.

-Solución Stock de Vitaminas

	g/l
Acido nicotínico	0.1
Piridoxina HCl	0.1
Tiamina HCl	0.02
Glicina	0.4
Mio-inositol	20.0

Agregar estas cantidades en un balón de 1000 ml con 500 ml de agua destilada, mezclar bien hasta que estén bien disueltas, completar el volumen con agua destilada. Utilizar 5 ml de esta solución para preparar un litro de medio.

-Solución Stock de Fe EDTA

	g/l
Sulfato de hierro heptahidratado	5.56
Na ₂ EDTA	7.46

Disolverlas en agua hirviendo, cada una por separado; unir las, y calentarlas de nuevo, dejarlas enfriar a oscuras; ajustar el volumen con agua destilada cuando estén frías. Utilizar 5 ml de esta solución para preparar un litro y medio.

- Sacarosa

- Agar

Ph= 5.7. Medir ph y ajustar a 5.7, cuando sea necesario agregar NaOH 1N en caso de solución ácida y HCl 1N en caso de solución básica (Hurtado y Merino, 1987).

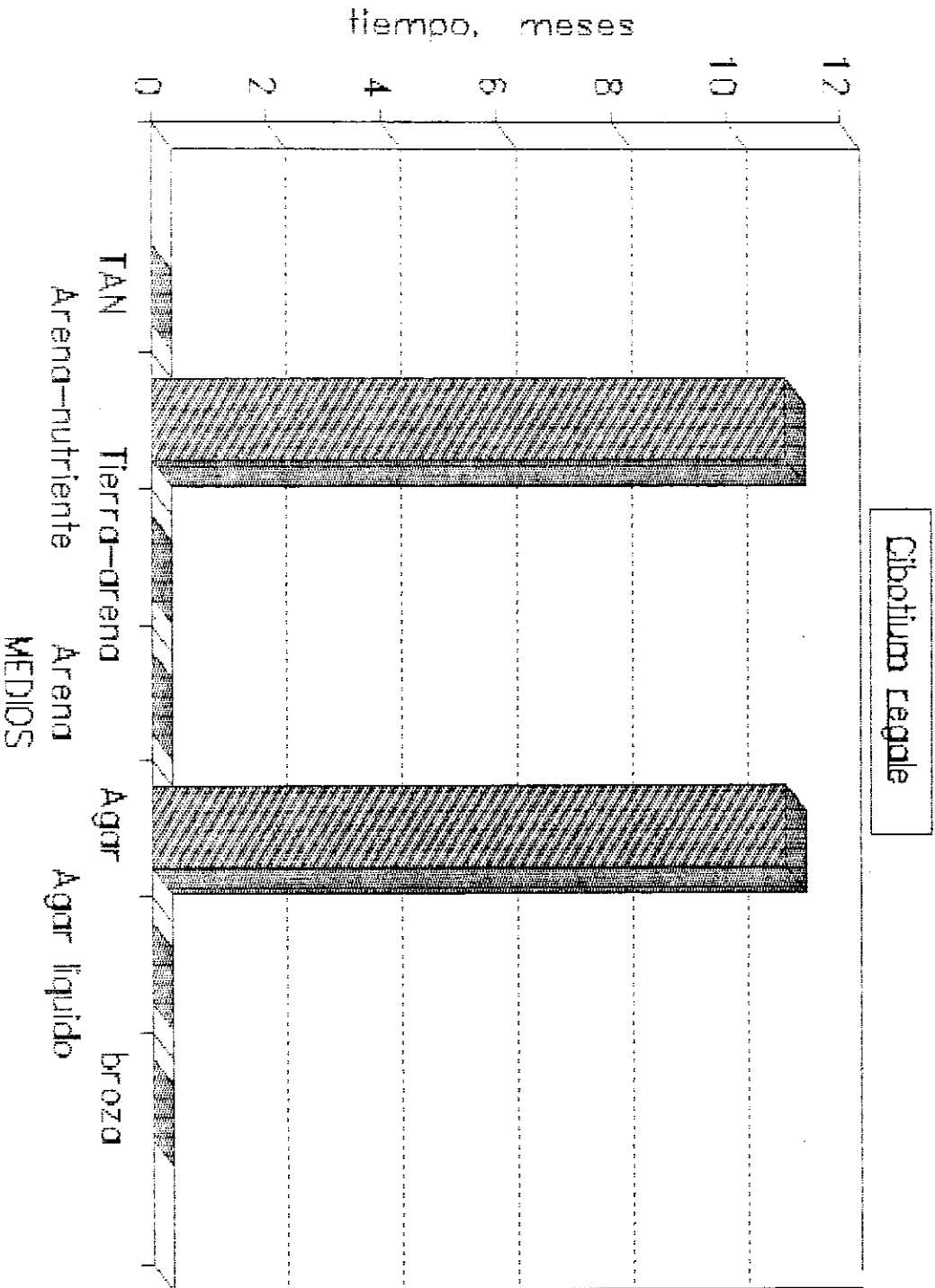
APENDICE 2.

Hoja de datos : Germinación de helechos arborescentes

no.de herbario	Medio utilizado	Siembra de esporas	Gameto fito	Cambio a medio nuevo	Esporo fito

GRAFICA No. 1

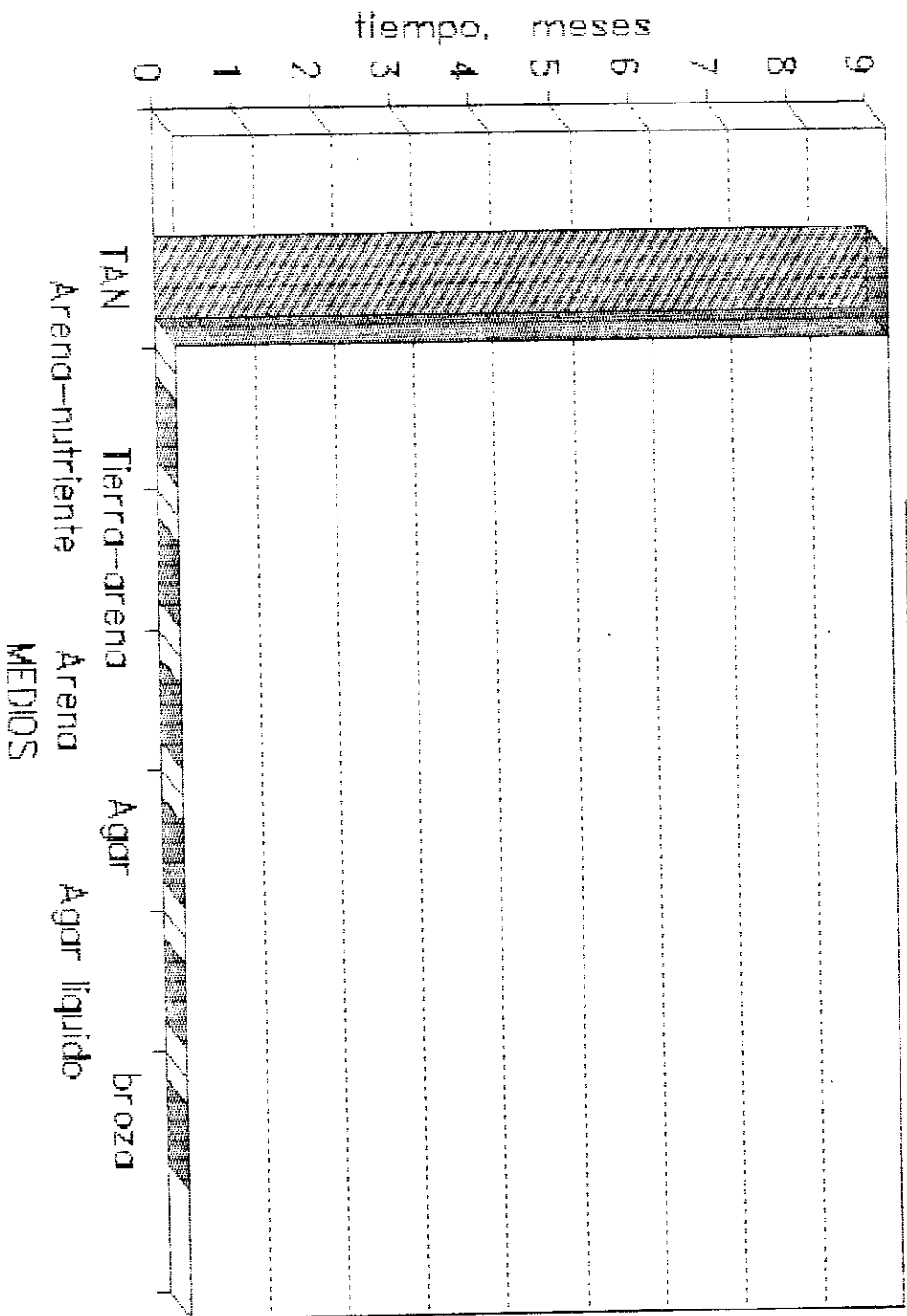
Tiempo en germinar de esporofito



GRAFICA No. 2

Tiempo en germinar de esporofito

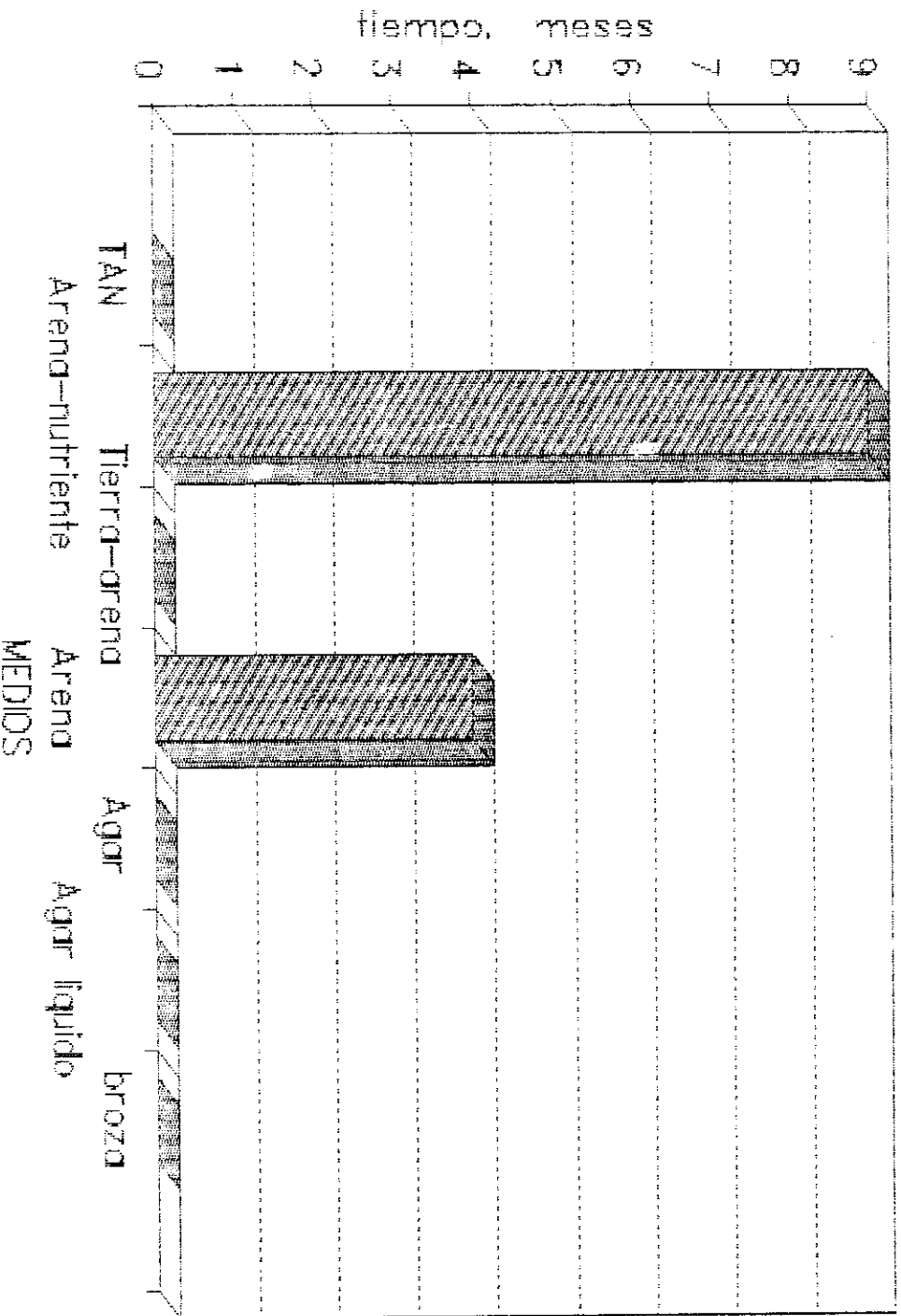
Dicksonia gigantea



GRAFICA No. 3

Tiempo en germinar de esporofito

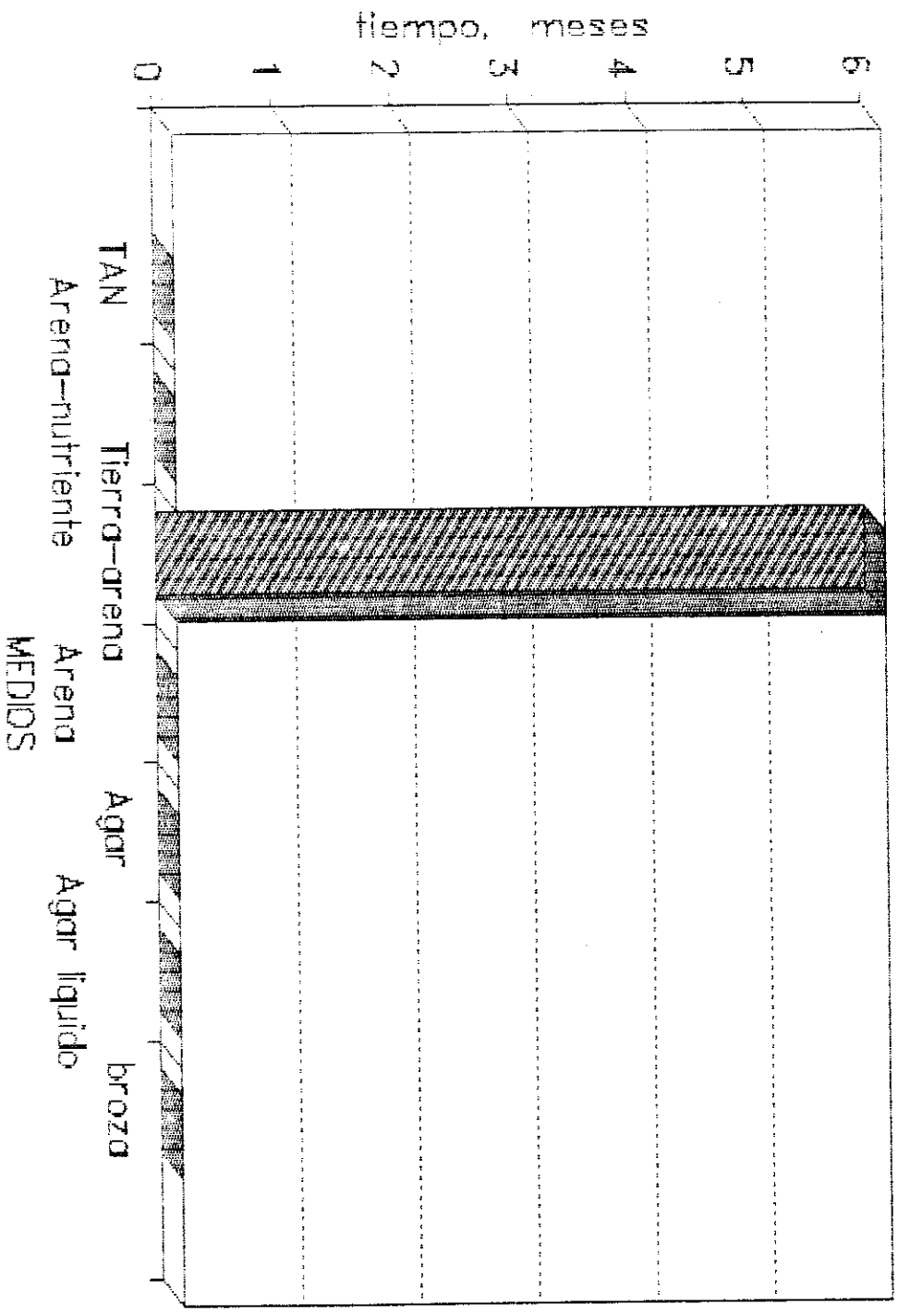
Alsophila salvinii



GRAFICA No. 5

Tiempo en germinar de esporofito

Lophosoria quadrripinnata



GRAFICA No. 6
PLANTAS GERMINADAS EN TODOS LOS MEDIOS

