



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN EDAFOLOGÍA

**REPRODUCCIÓN DE *Cyathea bicrenata*
LIEBMANN PARA SU CONSERVACIÓN Y
POSIBLE PROPAGACIÓN COMERCIAL**

SAMANTA ADRIANA REYES MOLINA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO DE MÉXICO

JULIO 2016

La presente tesis, titulada: **Reproducción de *Cyathea bicrenata* Liebmann para su conservación y posible propagación comercial** realizada por la alumna: Samanta Adriana Reyes Molina, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: _____

DR. HECTOR GONZÁLEZ ROSAS

ASESOR: _____

DR. VICTOR HUGO VOLKE HALLER

ASESORA: _____

DRA. ANA MARIA CASTILLO GONZÁLEZ

ASESORA: _____

DRA. CARMEN JACINTO HERNÁNDEZ

ASESOR: _____

DR. GABINO GARCÍA DE LOS SANTOS

MONTECILLO, TEXCOCO, MÉXICO

JULIO 2016

Dedicatoria:

Dedicada a la memoria de Lula, Colpos, Capi, y Frijol



“Cuando el hombre se apiade de todas las criaturas sintientes, solo así será noble”

Buda

Agradecimientos:

Agradezco al universo por haberme concedido, la oportunidad de comprender un poco, una parte de nuestra hermosa naturaleza.

A los helechos arborescentes, gracias por haberme permitido la recolecta de sus esporas, espero que esta pequeña contribución, sirva para que su estancia en este planeta siga otros mil millones de años más.

Al Colegio de Postgraduados, gracias por aceptarme y hacerme una pequeña parte de esta gran institución.

Al pueblo de México y a CONACYT gracias por apoyarme con el financiamiento de mi beca.

Gracias Mama[†]: Por estar en espíritu SIEMPRE conmigo.

Gracias Papa: Por guiarme hasta esta etapa de mi vida académica. TE AMO

Gracias Lore, Bren, Brenducita, Roy, Diego, y Nemi por ser mi familia y creer en mí.

Al Dr. Héctor González Rosas, gracias por invitarme a participar en su proyecto de investigación. Por apoyarme en la dificultades que se presentaron en la investigación; por sus consejos, paciencia y enseñarme a ver la ciencia de otra manera. Muchas gracias.

Al Dr. Víctor Hugo Volke Haller, muchas gracias por todo lo que aprendí en las salidas al campo, sus sabias asesorías, su paciencia, excelente carácter y comprensión.

A la Dra. Ana María Castillo González, le agradezco el interés mostrado para que esta investigación surgiera de la mejor manera, gracias por todas sus asesorías, su tiempo, por

compartir conmigo su valioso conocimiento, por su real preocupación, por conducirme y guiarme. Por ser un gran ejemplo de mujer a seguir.

A la Dra. Carmen Jacinto Hernández, muchas gracias por sus observaciones, su paciencia mostrada, sus sabios consejos, su disponibilidad de ayudar, sus correcciones. Por ser un gran ejemplo de mujer a seguir.

Al Dr. Gabino García de los Santos, Gracias por todo lo aprendido en su curso, por su tiempo, por sus asesorías, observaciones y tiempo.

Al Dr. Víctor Chaparro Ordaz gracias por el tiempo en brindarme asesorías y ayudarme en la interpretación de mis resultados.

Al Dr. Cesar Carvajal, gracias por sus asesorías, sus observaciones en mi investigación, su tiempo y conocimiento en las recolectas de campo.

Al Lic. Víctor Manuel Díaz Silva gracias por su valiosa ayuda en la traducción.

A la Lic. Carmen Padilla, gracias por siempre resolver las problemáticas de una gran institución como lo es el Colegio de Posgraduados. Por siempre tener una actitud de eficiencia y ayuda para los demás y una excelente actitud asertiva. Muchas gracias.

A mis terapeutas que me acompañaron en mi estancia Doctoral: Mariana Bárcenas Badillo, Amín Serrano; especialmente a Rebeca Peralta, gracias por haber transformado mi vida, no hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Muchas gracias, a ustedes por darme el apoyo necesario para nunca desistir, por escucharme, aconsejarme y apoyarme en cada aspecto de mi vida.

A mis amiga(o)s mencionados por orden alfabético: Andreita, Erasmo, Dianita, Fercita, Gaby, Jorge, Lolita, Marlen, Nadia, Paty, Pedro, Sarai, Sinai Vikita, Vivi y Xomyta sin ustedes la vida no sería igual, les agradezco a cada uno todo lo que me han ayudado a crecer como ser humano, gracias por soportarme, los AMO EN EXCESOiiii.

A mis hermosos ángeles que siempre me acompañan en los desvelos, en la escritura de la tesis, en la elaboración de las tareas, mientras estudiaba para los exámenes, en mi tristeza, nervios, alegría y depresión: Gala, Dalí, Katara, Greta, Vangogh, Mapache, Gris, Don Shirgo', Cornell' y Lila' GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.💙

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
HIPÓTESIS GENERAL.....	5
HIPÓTESIS PARTICULARES.....	5
CAPITULO I.....	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
Helechos.....	8
Viabilidad de esporas.....	9
Esporas clorofílicas.....	11
Almacenamiento de esporas.....	13
Estatus de conservación.....	14
Recolecta de esporas.....	14
Gametofitos.....	15
Reproducción del gametofito o prótalo.....	16
Arquegonios.....	17
Anteridios.....	18
Anteridiógenos.....	18
Suspensor.....	19
Fecundación.....	19
Tipos de fecundación.....	20
Propágulos.....	23
Aposporia.....	23
Apogamia.....	23
Helechos eusporangiados.....	23
Helechos leptoesporangiados.....	24
Ciclo biológico de los helechos.....	24
Descripción botánica de la familia Cyatheaceae.....	26

Descripción botánica de la especie.....	26
Distribución de <i>Cyathea bicrenata</i>	27
Tipo de spora.....	28
Germinación.....	29
Patrón de germinación.....	30
Sustratos.....	30
Esterilización de sustratos.....	31
Siembra de las esporas.....	31
Humedad.....	32
Nutrición.....	32
LITERATURA CITADA.....	34

CAPITULO II

PROTOCOLO PARA LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Cyathea bicrenata* Liebm. EN CULTIVO *IN VITRO*

RESUMEN.....	39
INTRODUCCIÓN.....	40
MATERIALES Y METODOS.....	42
<i>Sitio de colecta.....</i>	<i>42</i>
<i>Obtención de material biológico.....</i>	<i>42</i>
<i>Desinfección de esporas.....</i>	<i>42</i>
Variables evaluadas.....	44
<i>Porcentaje de germinación.....</i>	<i>44</i>
<i>Desarrollo del gametofito.....</i>	<i>44</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	49
LITERATURA CONSULTADA.....	51

CAPITULO III

GERMINACIÓN DE ESPORAS Y OBTENCIÓN PLANTULAS DE *Cyathea bicrenata* LIEBMANN EN DIFERENTES SUSTRATOS

RESUMEN.....	56
INTRODUCCIÓN.....	57
MATERIALES Y METODOS.....	58
Primera fase.....	59
<i>Recolecta del material vegetal.....</i>	<i>59</i>
<i>Recolecta del suelo.....</i>	<i>59</i>
Segunda fase.....	60
<i>Siembra de las esporas.....</i>	<i>60</i>
Tercera fase.....	62
<i>Elección de sustratos.....</i>	<i>62</i>
<i>Análisis físicos de sustratos.....</i>	<i>62</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
<i>Análisis de suelo.....</i>	<i>64</i>
<i>Capacidad de campo y punto de marchitez.....</i>	<i>66</i>
<i>Análisis de sustratos.....</i>	<i>67</i>
CONCLUSIONES.....	76
LITERATURA CITADA.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Título	Página
CAPITULO II	
Cuadro 1. Porcentaje de concentraciones de NaOCl y etanol en diferentes tiempos de exposición en desinfectantes utilizados en las esporas de <i>C. bicrenata</i>	44
CAPITULO III	
Cuadro 1. Tamaño de partícula de sustratos utilizados en la germinación, prótalos y esporofitos desarrollados a partir de esporas de <i>C. bicrenata</i>	61
Cuadro 2. Determinación de textura del suelo por el método de Boyoucos (1962).....	64
Cuadro 3. Determinación de pH, conductividad eléctrica y porcentaje de materia orgánica.....	65
Cuadro 4. Determinación de bases intercambiables y microelementos en el suelo.....	66
Cuadro 5. Resultados de pH en diferentes sustratos y suelo.....	68
Cuadro 6. Propiedades físicas de los sustratos.....	71
Cuadro 7. Numero de prótalos con esporofito y prótalos sin esporofito.....	72
Cuadro 8. Numero de prótalos con esporofito y prótalos sin esporofito en 1 mg de esporas de <i>C. bicrenata</i> en diferentes sustratos.....	74
Cuadro 9. Numero de prótalos con esporofito y prótalos sin esporofito en 10 mg de esporas de <i>C. bicrenata</i> en diferentes sustratos.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página
CAPITULO I	
Figura 1. Fecundación cruzada o alogamia.....	20
Figura 2. Autofecundación intergametofítica.....	21
Figura 3. Autofecundación intragametofítica.....	22
Figura 4. Ciclo de alternancia de generaciones de un helecho.....	25
Figura 5. <i>Cyathea bicrenata</i>	27
Figura 6. Soros de <i>Cyathea bicrenata</i>	27
Figura 7. Distribución geográfica de <i>Cyathea bicrenata</i>	28
Figura 8. Esporas y esporangio de <i>Cyathea bicrenata</i>	29

CAPITULO II

Figura 1. Porcentaje de germinación de esporas de <i>C. bicrenata</i> . En cuatro tiempos de exposición en NaOCl (35 %) a diferentes pH.....	50
Figura 2a. Espora trilete de <i>C. bicrenata</i> a los 4 días de su establecimiento in vitro (40x).....	50
Figura 2b. Espora germinada de <i>C. bicrenata</i> a los 30 días después de su cultivo.....	50
Figura 2c. Formación de rizoides y desarrollo de células de <i>C. bicrenata</i> a los 43 días después de su cultivo.....	50

Figura 2d. Elongación y formación de gametofito.....	50
Figura 2e. Prótalo a los 53 días.....	50
Figura 2f. Masa de gametofitos laminares en medio MS solido.....	50
Figura 2g. Cultivo de esporas en medio MS con pH 5.....	50

CAPITULO III

Figura 1. Curva de retención de humedad del suelo.....	67
Figura 2. Sustratos donde se presentó germinación, formación de prótalos y presencia de esporofitos de <i>C. bicrenata</i>	72
Figura 3. Plántula de <i>C. bicrenata</i> obtenida del sustrato de peat moss a los 476 días.....	73
Figura 4. Curva de retención de agua en sustrato peat moss.....	75
Figura 5. Curva de retención de agua en sustrato peat moss+perlita (1:1).....	75
Figura 6. Curva de retención de agua en sustrato perlita.....	76

RESUMEN GENERAL

REPRODUCCIÓN DE *Cyathea bicrenata* LIEBMANN PARA SU CONSERVACIÓN Y POSIBLE PROPAGACIÓN COMERCIAL

Reyes Molina Samanta Adriana D.C

Colegio de Postgraduados, 2016.

Cyathea bicrenata es un helecho arborescente que se encuentra en algunos bosques mesofilos de montaña de México. Debido a que se encuentra bajo el criterio de especie sujeta a protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010, por ser una especie amenazada por diversos factores de índole antrópicos. La conservación es un proceso que se lleva a cabo mediante estrategias tales como el cultivo *in vitro* y cultivo en sustratos a fin de salvaguardar especies con riesgo inminente de desaparecer. Con el objetivo de generar un modelo para la germinación *in vitro* de esporas a fin de obtener esporofitos para realizar prácticas de cultivo y conservación, se experimentó con la germinación de esporas de *Cyathea bicrenata* Liebmann (Cyatheaceae). Se comparó la eficacia de tres métodos de desinfección (Dyer, Ford y aspersion de etanol); las variables que se consideraron fueron pH (intervalo de 4 a 6.5), concentración de NaOCl (0.02, 0.04, 0.06, 1, 2, 35 y 50 %) y tiempo de desinfección (5, 10, 15 y 20 minutos). Al cabo, las esporas fueron cultivadas en medio de Murashige y Skoog (concentración al 100 %). Se estimó la cobertura de las cajas de cultivo mediante la escala de Braun-Blanquet. La germinación más exitosa se logró con NaOCl al 35 %, con 5 y 10 minutos de desinfección y pH inferior a 6.0 (con pH 6.0 y 6.5 no existió germinación). Por otra parte se realizaron experimentos de germinación en sustratos para la obtención masiva, de gametofitos y esporofitos. Se inocularon 100 mg de esporas en siete sustratos: fibra de coco, peat moss, vermiculita,

perlita, tezontle, fertilizante orgánico con bacterias aeróbicas y humus de lombriz. De acuerdo a sus propiedades físicas. Los resultados indican que el mejor sustrato fue el peat moss, en donde se presentó la germinación y formación del prótalo; en el suelo (testigo) y en perlita hubo germinación, pero no la formación de prótalos. En términos generales el tipo de sustrato y algunas propiedades físicas, como la retención de humedad, fueron los factores que determinaron la germinación, la formación de prótalos y la emergencia de esporofitos.

Palabras clave: *Cyathea bicrenata*, esporas, germinación, medio MS, NaOCl, pH, sustrato, esporofitos.

GENERAL ABSTRACT

REPRODUCTION OF *Cyathea bicrenata* LIEBMANN FOR ITS CONSERVATION AND POSSIBLE COMMERCIAL PROPAGATION

Reyes Molina Samanta Adriana

Cyathea bicrenata is a tree fern that is found in some cloud forests of Mexico and is under the criterion of species subjected to special protection according to the NOM-059-SEMARNAT 2010, for being a threatened species by various factors of anthropic nature. Conservation is a process that is carried out using strategies such as *in vitro* culture and substrate culture to safeguard species at imminent risk of disappearing. Spore germination of *Cyathea bicrenata* Liebmann (Cyatheaceae) was carried out in order to generate a model for *in vitro* germination of spores to obtain sporophytes for cultivation and conservation practices. The effectiveness of three methods of disinfection was compared (Dyer, Ford and ethanol spraying). The variables considered were pH (ranging from 4 to 6.5), concentration of NaOCl (0.02, 0.04, 0.06, 1, 2, 35 and 50%) and disinfection time (5, 10, 15 and 20 minutes). After all, the spores were grown on Murashige and Skoog medium (100 % concentration). The coverage of culture plates was estimated using the Braun-Blanquet scale. The most successful germination was achieved with 35 % NaOCl, with 5 and 10 minutes disinfection and a pH less than 6.0 (at pH 6.0 and 6.5 there was no germination). Moreover germination experiments were performed on substrates for mass production of gametophytes and sporophytes. 100 mg of spores were inoculated using seven substrates: coconut fiber, peat moss, vermiculite, perlite, volcanic rock, organic fertilizer with aerobic bacteria and vermicompost. According to its physical properties. The results indicate that the best substrate was peat moss, where germination and formation

of prothallus was presented; in soil (control) and perlite germination occurred, but not prothallus formation occurred. In general terms the type of substrate and some physical properties such as moisture retention were the factors that determined the germination, prothallus formation and the emergence of sporophytes.

Keywords: *Cyathea bicrenata*, spores, germination, MS medium, NaOCl, pH, substrate, sporophytes.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el pH, tiempo de desinfección y desinfectante adecuado para la germinación de las esporas de *Cyathea bicrenata*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimación de la cobertura de la germinación de esporas y formación de prótalos bajo diferentes condiciones de pH en el medio de cultivo y desinfección.
- Describir el ciclo biológico y contribuir al conocimiento sobre su biología.

HIPÓTESIS GENERAL

- El pH es un factor limitante para el establecimiento del gametofito y esporofito, es probable que *Cyathea bicrenata* responda de manera favorable en un pH más ácido.

HIPÓTESIS PARTICULARES

- Conocer el porcentaje de prótalos nos dará conocimiento de que porcentaje de germinación llega a la etapa de esporofito.
- Conocer el ciclo biológico de *Cyathea bicrenata* permitirá conocer la capacidad para su propagación

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

La conservación de las especies vegetales es uno de los aspectos principales en el mantenimiento del bosque. Muchas especies silvestres se hallan en clara regresión, si no es que en peligro de desaparecer. Tal retroceso se debe a causas muy diversas: talas indiscriminadas, recolección excesiva de especies de interés ornamental, farmacéutico, industrial, cosmético o alimentario, incendios provocados o accidentales, expansión de las ciudades o nuevos asentamientos humanos, prácticas silvícolas mal realizadas, como exceso de rozas o aclareos indiscriminados, carga excesiva de ganado herbívoro silvestre o de pastoreo y propagación difícil que impide una regeneración normal (Troncoso de Arce *et al.*, 2004).

Los helechos forman parte de las especies que habitan los bosques mesófilos de montaña (BMM). En este tipo de vegetación, los helechos son un componente estructural importante en el bosque, donde desempeñan funciones ecológicas relevantes (Alvaréz-Zuñiga *et al.*, 2012). México registra la mayor riqueza con 14 especies de helechos arborescentes (Mickel y Smith, 2004) que se encuentran en la zona ecológica templada húmeda, que incluye al bosque mesófilo de montaña (BMM) y tienen una distribución limitada y fragmentaria a lo largo de las principales cadenas montañosas del país (Luna-Vega *et al.*, 2006).

La disminución de las poblaciones de *Cyathea bicrenata* Liebmann han contribuido a su clasificación en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Entre los factores que han colocado a esta especie en protección especial, están la colecta ilegal bajo estas circunstancias, la propagación de este helecho es una necesidad vital para su conservación,

desafortunadamente sobre el cultivo de helechos arborescentes existe muy poca información nacional e internacional, ya que gran parte del conocimiento lo manejan los viveristas o coleccionistas de helechos, y dicha información que no está disponible a los aficionados o profesionales, como paisajistas, agrónomos y biólogos.

La germinación de las esporas *in vitro* es una opción que ha permitido obtener numerosos esporofitos en un lapso de 22 meses en el caso de *C. australis* R. Br. Domin (Goller y Rybczynski, 1995), cinco en *Dicksonia sellowiana* Hook y cuatro para *C. schanschin* Mart. (Prospero *et al.*, 1990). *In situ* se ha observado la formación de esporofitos; sin embargo, es escasa la sobrevivencia.

Por ende, comprender la germinación de helechos y requisitos de desarrollo temprano podrían servir de base para el establecimiento de métodos alternativos de propagación que pueden contribuir a su conservación. Los métodos de cultivo *in vitro* se proporcionan condiciones controladas para la propagación de esporofitos y el estudio de la biología de helechos, ya que los requerimientos de germinación y crecimiento de las especies neotropicales son poco conocidos (Fernández *et al.*, 1999; Cassanego *et al.*, 2010).

Además, se tienen problemas con las condiciones de pH, ya que es un factor limitante para el establecimiento del helecho (Petersen, 1985). Los estudios han demostrado que esta especie de helecho puede presentar respuestas variadas a diferentes valores de pH. Mientras que las esporas de algunas especies germinan en medio ácido fuerte (Whittier y Moyroud, 1993) o en un amplio rango de pH (Nondorf *et al.*, 2003; Viviani y Randi, 2008), algunas esporas de helechos no son capaces de germinar en condiciones ácidas fuertes (Nester y Coolbaugh, 1986). Para el caso de *Cyathea bicrenata* y hasta donde sabemos,

no hay información en la literatura sobre el efecto del pH en la germinación y el crecimiento inicial.

REVISIÓN DE LITERATURA

Helechos

Las hojas de los helechos se llaman frondas, en el envés se encuentran los soros donde se encuentran los esporangios donde se producen las esporas. El tallo del que nacen se prolonga bajo la tierra formando un rizoma. Los musgos y los helechos tienen distintos ciclos vitales, aunque en una fase ambos producen esporas. Esa fase se llama reproducción asexual, en la cual la reproducción de un nuevo organismo proviene de una sola célula (Parker, 2010).

Los helechos también se reproducen por alternancia de generaciones. Las esporas que caen en lugares sombreados y húmedos tienen más posibilidades de germinar. Las características de las plantas vasculares, son arquegoniadas con alternancia de generaciones heteromórfica y con esporofito como fase dominante e independiente. Presentan ramificación dicótoma, rara vez monopódica, vascularización solo por la presencia de traqueidas, a menudo escalariformes, rara vez acompañadas de vasos verdaderos, son raras las formaciones vasculares secundarias con una cutícula impermeable, los esporangios epifilos, hipofilos o terminales, rara vez epicaulinales, dispersos o agrupados en soros. Presentan homosporia dominante, pero con algunas variaciones de gametofitos libres o más o menos incluidos, foliáceos y taloideos, rara vez caulinares y vascularizados reproducción por gametos masculinos flagelados, implicando la presencia de agua aparición abundante de apogamia (Parker, 2010).

Esporas

Las esporas de los helechos son estructuras microscópicas unicelulares, con dimensiones comprendidas entre menos de 25 hasta 100 micrómetros, y su producción puede ser inmensa, como es el caso de *Pteridium aquilinum*, en el cual una hoja puede producir aproximadamente en 1 gramo (300 millones de esporas) y *Dicksonia antarctica* 750 millones. Pero a pesar de esta gran cantidad de esporas no todas llegan a producir esporofitos, siendo numerosos los factores que limitan esta producción (Alarcón-Rojas y Peláez-Peláez, 2008).

Las esporas están formadas por una célula con una serie de estructuras protectoras, el perisporio, que suele presentar una ornamentación específica. Estas pueden estar en estado latente durante un tiempo que puede variar de meses a años, a la espera de condiciones favorables para su germinación. Una vez alcanzadas estas condiciones, se produce la germinación de la espora dando lugar al prótalo, organismo autónomo clorofílico de reducido tamaño (rara vez alcanza el cm) y que en un gran número de especies presenta forma cordada (Méndez y Murillo, 2014).

La cantidad de esporas de los helechos es variable; la mayoría produce varios cientos de miles de esporas, que pueden dispersarse por acción de la gravedad, fuerzas electrostáticas, agua, corrientes de viento, etc. En las regiones tropicales o subtropicales la primera precipitación después de una temporada seca, arrastra la mayor cantidad de esporas suspendidas en el aire o retenidas en la copa de los árboles (Martínez *et al.*, 2012).

Viabilidad de esporas

Las esporas de los helechos son estructuras microscópicas unicelulares, cuyas dimensiones van desde menos de 25 a más de 100 micras. La madurez de los esporofitos de los helechos se logra, en la mayoría de los casos, en un lapso que abarca desde 1 a 10 años, una vez que maduran, la producción puede ser inmensa. En especies de helechos tropicales y templados, bajo cultivo, se ha calculado que el contenido de esporas de hojas individuales varían de 750 000 en *Asplenium trichomanes* L. hasta 750 millones en *Dicksonia antartica* Lab. (Alarcón-Rojas y Peláez-Peláez, 2008).

La viabilidad de las esporas (tiempo en que permanecen viables, esto es que son capaces de germinar) y la tasa de crecimiento de los gametofitos, son factores básicos para un exitoso establecimiento de los helechos en un nuevo hábitat después de la dispersión.

Estos factores están controlados por propiedades intrínsecas como el genotipo, edad y latencia y por factores extrínsecos como los son las diferentes condiciones del ambiente, del sitio donde se liberan y depositan las esporas, del pH del suelo, de la humedad, la temperatura, la luz y de los competidores, entre otros elementos.

Pero también las características fisiológicas de las esporas, como sería el caso de la presencia o ausencia de clorofila, repercuten en el tiempo de germinación (latencia) y en el desarrollo de las primeras células de los gametofitos jóvenes. La viabilidad o longevidad de las esporas de los helechos es variable, así por ejemplo, las esporas clorofílicas muestran una cierta tendencia a germinar más rápidamente que las no clorofílicas (Pérez y Reyes, 1993).

La viabilidad de las esporas varía considerablemente entre las especies y se basa en la presencia de clorofila. Algunas esporas no clorofílicas vivirán hasta 130 años si se almacenan correctamente.

Las esporas que se mantienen bajo condiciones de humedad, han mostrado una mayor capacidad de germinación, que las que se mantienen en condiciones secas (Lindsay *et al.* 1992). El almacenamiento húmedo es a 5 °C y es considerada la temperatura óptima para el almacenamiento de esporas, ya que mantiene una alta viabilidad, minimiza la contaminación bacteriana, fúngica y evita la germinación en la oscuridad (Quintanilla *et al.*, 2002). Sin embargo, incluso en condiciones de almacenamiento deseables, una disminución de la viabilidad se ve afectada, al aumentar la edad de las esporas. La adición de sacarosa al medio de germinación, puede mejorar la germinación de las especies de helechos almacenados de manera seca a 4 °C, pero el efecto disminuye con el tiempo (Raghavan 1989).

Las esporas de los helechos pueden permanecer latentes hasta que se cumpla una condición especial. La enorme cantidad de esporas producidas por un helecho, proporciona un método eficaz para la dispersión en el espacio, mientras que un período de descanso forzado, asegura su dispersión en el tiempo. El rompimiento de la dormancia de las esporas requiere de hormonas y luz, pero el alcance de estos, no se comprende totalmente (Raghavan 1989).

Esporas clorofílicas

Las esporas clorofílicas, o "verdes", son esporas que continúan la fotosíntesis después de haber sido arrojadas por la planta madre. Esto acorta efectivamente el periodo de vida útil de las esporas. Las esporas verdes tienen una vida media de 48 días, mientras que las

esporas no verdes viven aproximadamente 3 años. La investigación sobre el almacenamiento para extender el período de viabilidad de las esporas verdes, sigue siendo estudiada (Raghavan 1989).

Las esporas clorofílicas tienden a germinar más rápido que las esporas no clorofílicas, posiblemente debido a los pigmentos fotosintéticamente activos, que permiten el crecimiento rápido para continuar en la búsqueda de las condiciones de germinación adecuadas. Las esporas verdes también tienen un mayor contenido de agua que las esporas no verdes, por lo que su período de vida útil, se puede aumentar evitando la desecación o la pérdida de agua (Raghavan 1989).

La viabilidad de las esporas clorofílicas es muy reducida, se inicia entre dos y siete días después de su liberación y dura unas pocas semanas; en cambio las esporas sin clorofila de paredes amarillentas, castañas o negras, presentan viabilidad media a extensa. En condiciones de laboratorio se ha observado que pequeños porcentajes de esporas de *Pteris vittata* comienzan a germinar a los dos o tres días después de su siembra, este proceso se mantiene hasta después de cincuenta días; en otros helechos, como el helecho arbóreo de Noroeste argentino, *Alsophila odonelliana*, se ha encontrado que las esporas son viables aún después de tres años de almacenamiento en frío a 3–5 °C (Martínez, 2012).

La longevidad y el envejecimiento de esporas se investigaron a finales de 1960 y 1970 (Lloyd y Klekowski 1970; Dyer 1979). Encontraron grandes diferencias entre la longevidad dependiendo las especies, y existió una correlación entre el tipo de esporas (verde vs no verdes) (Lloyd y Klekowski 1970). El rápido deterioro de las esporas verdes, se atribuyó a

la intolerancia a la desecación, altas tasas metabólicas, y la falta de latencia (Kato 1976). Estas hipótesis lanzaron la idea de que las esporas verdes presentan un comportamiento recalcitrante análogo a las semillas (Roberts 1973).

Las esporas no verdes, por otra parte, podrían ser tratadas como semillas ortodoxas (Roberts 1973), y las condiciones secas, ya sea a temperatura ambiente o baja temperatura, podrían ser las condiciones de almacenamiento recomendadas (Dyer 1979).

Almacenamiento de esporas

El almacenamiento de esporas de helechos para la conservación *ex situ*, ha recibido poca atención durante los últimos 50 años en comparación con la semilla de almacenamiento. Las esporas de los helechos tanto clorofílicas y no clorofílicas, parecen ser tolerantes a la desecación, pero hay una variación sustancial en la longevidad entre los dos tipos de esporas y entre diferentes especies dentro de cada categoría (Ballesteros, 2010).

Se tiene escaso conocimiento acerca de las causas del envejecimiento de las esporas, durante el almacenamiento y si las esporas verdes y no verdes presentan los mismos mecanismos. La longevidad de ambos tipos de esporas, se reduce cuando se almacenan a temperaturas convencionales de congelador (-10 a -30 °C), lo que sugiere que las esporas de helechos presentan analogía a la fisiología a las semillas, clasificados en la categoría de almacenamiento intermedio o su comportamiento de almacenamiento previamente no está caracterizado. Sobre la base de los conocimientos actuales sobre el almacenamiento de esporas de helechos en congeladores convencionales, la criopreservación no es sólo factible, pero es necesaria para maximizar la longevidad de esporas para la preservación a largo plazo (Ballesteros, 2010).

Estatus de conservación

Si bien, los helechos producen grandes cantidades de esporas, cuando estas logran germinar son muy vulnerables a los cambios en el microambiente, y a la competitividad en el área de colonización e iluminación directa. Los efectos de adaptación, dependerán de la rapidez con la que germinan las esporas y el tiempo necesario para desarrollar sus gametofitos (Lloyd y Klekowski, 1970).

Recolecta de esporas

La frescura y la limpieza son los dos factores más importantes que se deben tomar en cuenta en la recolecta de material para propagar. Las esporas recién recolectadas germinan más rápido y a un mayor ritmo que las esporas más antiguas. El método para recolectar esporas, es identificar una fronda fértil en la planta. Una fronda que es demasiado joven, sus esporas tendrán soros de color blanco-verde. Una fronda que ya ha lanzado sus esporas mostrará aberturas irregulares, y es a menudo de color marrón. Si no hay otro material disponible, esto es una información útil para considerarse. En el mecanismo de liberación de esporas, el anillo no libera todo el material de esporas, en general, deja unos pocos granos de esporas atrás. La técnica de "raspado" con un cuchillo afilado puede ayudar a obtener unos granos de esporas, cuando no se dispone de ninguna otra (Hoshizaki y Moran 2001).

La mejores esporas provienen de las plantas más saludables, más vigorosas y generalmente son las más fácil de germinar. La técnica adecuada para la recolección de esporas, es mediante la colocación de una cara de la fronda fértil en un pedazo de papel que después se cubrirá y se colocará en una bolsa de papel. Las bolsas de plástico no se

deben utilizar para la recolecta de esporas, ya que guardan humedad y esto puede conducir al desarrollo de microorganismos. La bolsa de papel se coloca en un lugar cálido y seco, así dará lugar a la liberación de esporas en el transcurso de 24 a 48 horas (Hoshizaki y Moran 2001). El nombre del helecho y la fecha de recogida debe ser registrado (Goudey, 1985).

Gametofitos

El gametofito es el equivalente de una flor en una angiosperma, ya que contiene el gameto masculino (anteridios) y gameto femenino (arquegonios). Cuando las condiciones son apropiadas, los anteridios se hinchan y liberan el esperma, que nadan a un ovario situado cerca de los arquegonios. La fertilización produce el embrión, y a su vez, el esporofito. Las principales funciones fisiológicas de las diferentes estructuras de los gametofitos de los helechos, han sido importantes limitaciones evolutivas en cuanto a las formas de crecimiento de estas estructuras. Se han utilizado modelos geométricos para definir las estructuras absorbentes, puntas de crecimiento y las formas planas de crecimiento, que en realidad podrían ser adoptadas para cada estructura gametofítica. La relación superficie/volumen se ha calculado para las estructuras absorbentes, el rizoide cada vez es más largo ya que proporciona la circunstancia geométrica más favorable para la absorción del agua y nutrientes, por lo que puede optimizar los procesos de absorción, que influyen en el crecimiento y forma de la estructura absorbente. En términos generales se puede interpretar, cómo las diferentes formas de crecimiento, pueden ofrecer ventajas específicas para lograr otros aspectos del proceso de fotosíntesis; crecimiento, fototropismo y el transporte de asimilados (Takahashi *et al.*, 2009). El prótalo es la denominada fase haploide en el ciclo de vida de los pteridofitos, esto quiere decir que sus

células poseen un solo juego cromosómico llamado n . También se le denomina gametofito, ya que será en el donde se produzcan los gametos para dar lugar a la siguiente fase. Los prótalos presentan estructuras muy simples, sin tallo ni hojas, ni tejido conductor. Sólo una lámina fina formada por células clorofílicas idénticas. No posee raíces y la fijación al suelo se produce mediante rizoides, que también contribuyen a la absorción de agua y sales minerales. Algunas especies y grupos presentan gametófitos diferentes a los anteriores. Por ejemplo, el género *Vandenbergia* presenta prótalos filiformes y ramificados, y en el grupo Psilotophytes son rizomatosos, incoloros y subterráneos (Méndez y Murillo, 2014).

Se han desarrollado estudios del gametofito de algunos helechos, donde se han descrito muchos aspectos de su desarrollo, incluida la germinación de la espora, los patrones de división, diferenciación celular, las respuestas reguladas por la luz, determinación del sexo y diferenciación de gametangios, las respuestas de las feromonas y la fertilización. Varios genes que regulan algunos de estos procesos se han clonado recientemente, por lo que es posible analizar cómo estos procesos son controlados en un nivel molecular (Banks, 1999).

Reproducción del gametofito o prótalo

El gametofito es originado por la germinación de una espora, al principio tiene forma de filamento del que se diferencian las primeras células alargadas, que serán los rizoides de una célula terminal, que se divide primero en una sola dirección, luego aparecen dos direcciones puede ser filamentoso o tuberoso, vivaz, subterráneo y con simbiosis micorrízica cordiforme, verde, taloideo, anual y autótrofo suele ser protándrico. Los anteridios aparecen en la parte posterior de los prótalos inmersos en ellos. En los grupos inferiores, con pared no diferenciada del resto del tejido excepto en la superficie, con un

elevado número de anterozoides en forma de pequeñas esferas en los grupos más evolucionados, con una pared de una capa de células (3 células en total), las células espermatógenas forman 16 o 32 anterozoides (Parker, 2010).

Arquegonios

Los gametangios femeninos o arquegonios tienen forma de botella, originan a la ovocélula o gameta femenina. Dentro del tejido del gametofito sólo emerge sobre la superficie una estructura tubular conocida como cuello del arquegonio que tiene la finalidad de proteger a la ovocélula y guiar a los anterozoides o gametas masculinas para que se produzca la fecundación (Martínez *et al.*, 2012).

Aparecen en las proximidades de la escotadura del prótalo, en los grupos más evolucionados se forman a partir de una célula superficial del prótalo, originando tres células superpuestas: 1) externa, que origina las células del cuello intermedia, que se alarga y se sitúa entre las células del cuello, dividiendo los núcleo en dos (se originan hasta 16 células en los grupos más primitivos), 2) la célula interna, que aumenta de tamaño, se divide en dos células muy desiguales, la pequeña es la célula ventral de la base del cuello la mayor será la ovocélula células del canal de cuello, 3) la célula ventral que origina una masa mucilaginosa (Parker, 2010).

Los helechos heterospóreos producen microsporas y megasporas que originan prótalos masculinos y femeninos, más pequeños que en los isospóreos el, desarrollo de los prótalos se realiza dentro de la espora, la pared se fisura cuando maduran los gametangios (Parker, 2010).

Anteridios

Los gametangios masculinos o anteridios se desarrollan entre las raíces del gametofito, por debajo de los arquegonios. Tienen el cuerpo globoso u ovoide, formado por tres células; una célula basal que constituye el pie; una célula anular, con una concavidad donde se alojan las gametas masculinas o anterozoides; y una célula opercular, que tiene la función de mantener cerrado el compartimento hasta que los anterozoides maduren. Cuando llega el momento de la liberación de los anterozoides, la célula opercular se desprende y las gametas masculinas o anterozoides salen al exterior. Estas gametas son células espiraladas con motilidad propia, por lo tanto necesitan un medio líquido para trasladarse hasta los arquegonios, producir la fecundación y originar nuevos esporofitos (Martínez *et al.*, 2012).

Anteridiógenos

Los gametofitos femeninos pueden producir feromonas u hormonas denominadas anteridiógenos. Según Menéndez *et al.* (2006) la composición química de los anteridiógenos corresponde a las giberelinas, hormonas que permiten el crecimiento de las plantas.

Los anteridiógenos tienen la capacidad de modificar la expresión sexual de los gametofitos de la gran mayoría de los helechos, induciendo la formación de gametofitos masculinos o bisexuales; de esta manera promueven el entrecruzamiento intergametofítico y por lo tanto el intercambio genético. Otra función de los anteridiógenos es estimular la germinación de las esporas que se almacenan en la oscuridad, por ejemplo cuando las esporas se encuentran cubiertas por la hojarasca del bosque, entre órganos vegetales o debajo del suelo.

En la naturaleza, los gametofitos crecen sobre sustratos saturados de agua y nutrientes que se generan sobre rocas o troncos tapizados de musgos y líquenes, allí crecen gametofitos de distintas especies, donde algunos producen anteridiógenos que estimulan la formación de gametas masculinas en gametofitos de otras especies y contribuyen de esta manera al cruzamiento de plantas de diferentes especies que pueden resultar en nuevas plantas denominadas “plantas híbridas”.

La formación de híbridos es un proceso muy frecuente entre los helechos y se manifiesta en el polimorfismo que se observa en las hojas de las plantas. Entre los helechos capaces de producir anteridiógenos, se encuentran *Anemia phyllitidis*, *Blechnum spicant*, *Campyloneurum angustifolium*, *Phlebodium aureum*, *Pteris vittata* (Martínez *et al.*, 2012).

Suspensor

Es un órgano que sirve para penetrar el embrión en el tejido nutritivo del prótalo, ligado al tipo endoscópico, cuando aparece la primera división del cigoto origina la célula del suspensor en la zona del cuello y la célula embrionaria, la cual se divide para originar la célula hipobasal junto al suspensor y la célula epibasal en el fondo del arqueogonio es considerado un órgano vestigial, aparece en los grupos más arcaicos (exceptuando *Tmesipteris*, *Psilotales*) (Méndez y Murillo, 2014).

Fecundación

Los anteridios que liberan los espermatozoides, al ceder la célula opercular los espermatozoides helicoidales aparecen en un extremo de una vesícula esférica y da a la aparición de numerosos flagelos en el polo opuesto donde se produce ácido málico que actúa quimiotácticamente, atrayendo a los espermatozoides tras la fecundación. El cigoto

se recubre de una membrana celulósica en prótalos monoicos y se asegura mejor la dispersión a costa de una gran homocigosis (Parker, 2010).

Tipos de fecundación

Según Rainker y Geiger (2008) el cruzamiento de los gametofitos puede ser de tres tipos:

- 1- Fecundación cruzada o alogamia: los gametos que se unen corresponden a gametofitos provenientes de distintas plantas (Figura 1).

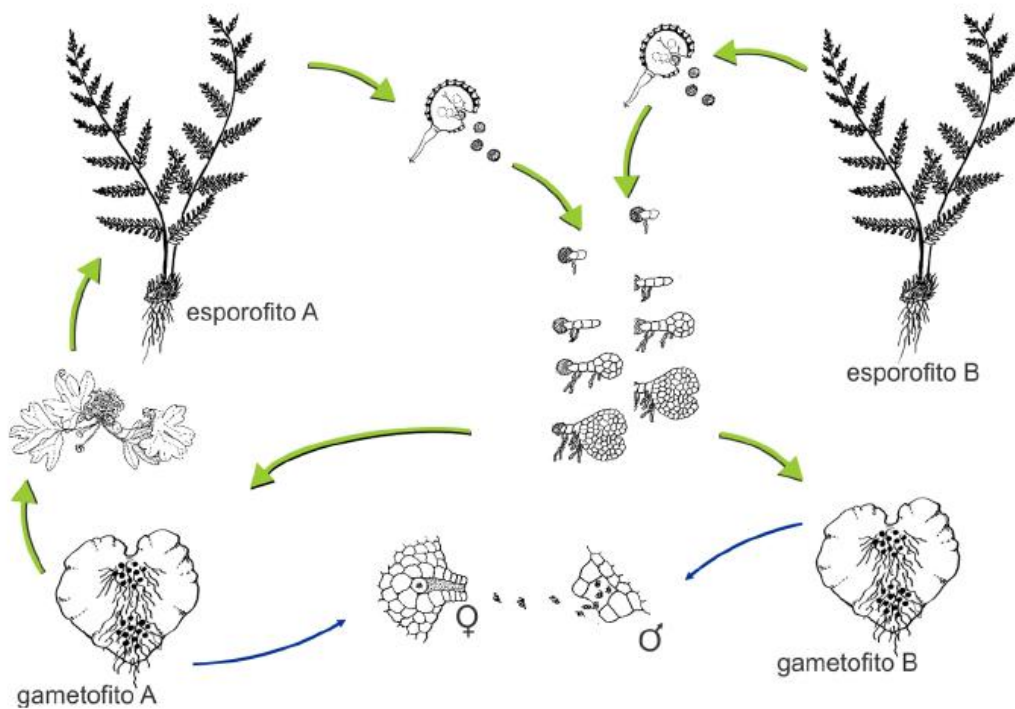


Figura 1. Fecundación cruzada o alogamia (Tomado de Martínez *et al.*, 2012).

2.- Autofecundación intergametofítica o autogamia: los gametos provienen de distintos gametofitos procedentes de una misma planta (Figura 2).

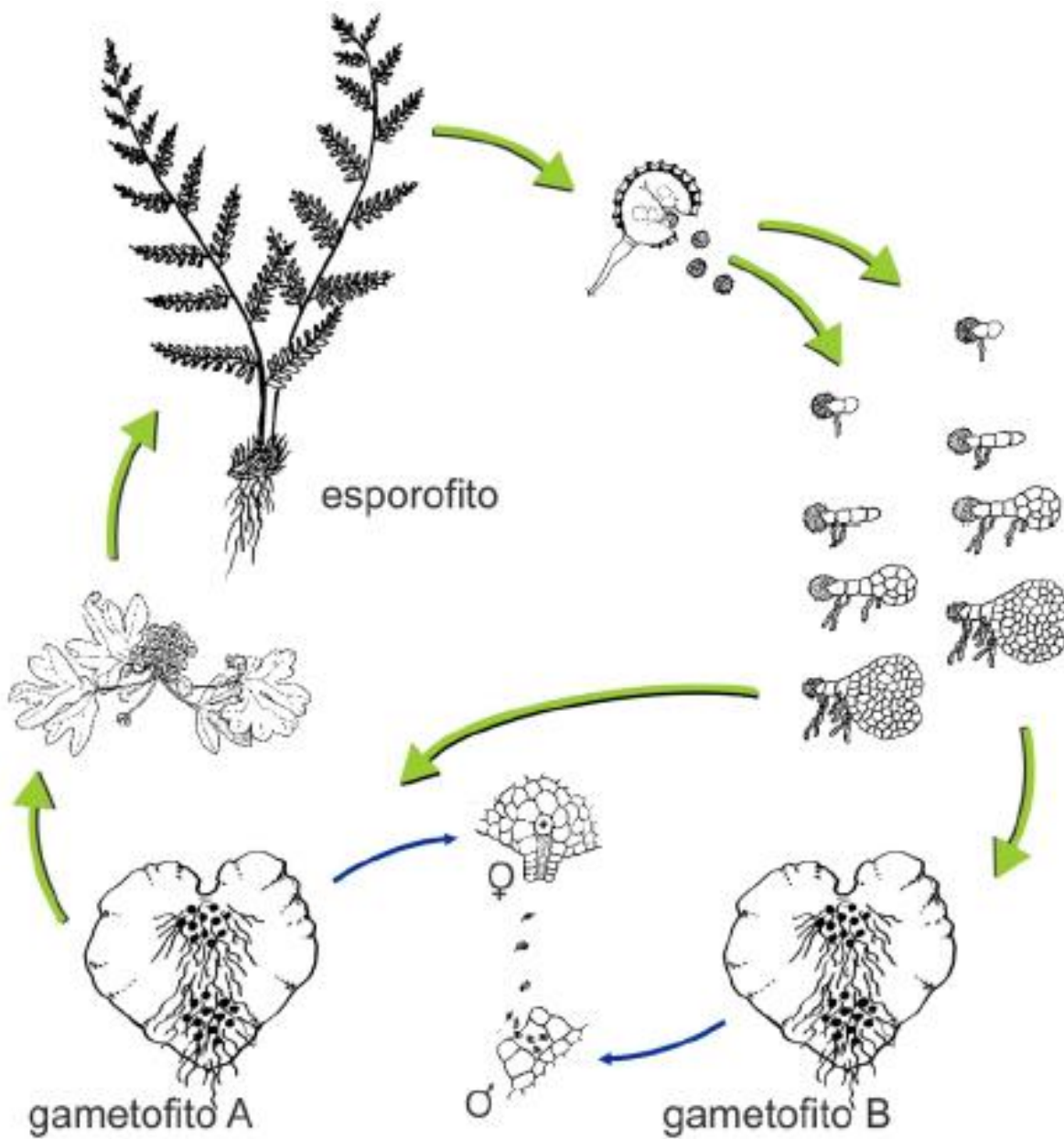


Figura 2. Autofecundación intergametofítica. (Tomado de Martínez *et al.*, 2012).

3- Autofecundación intragametofítica o automixis: la fecundación se produce entre gametos de un mismo gametofito (Figura 3).

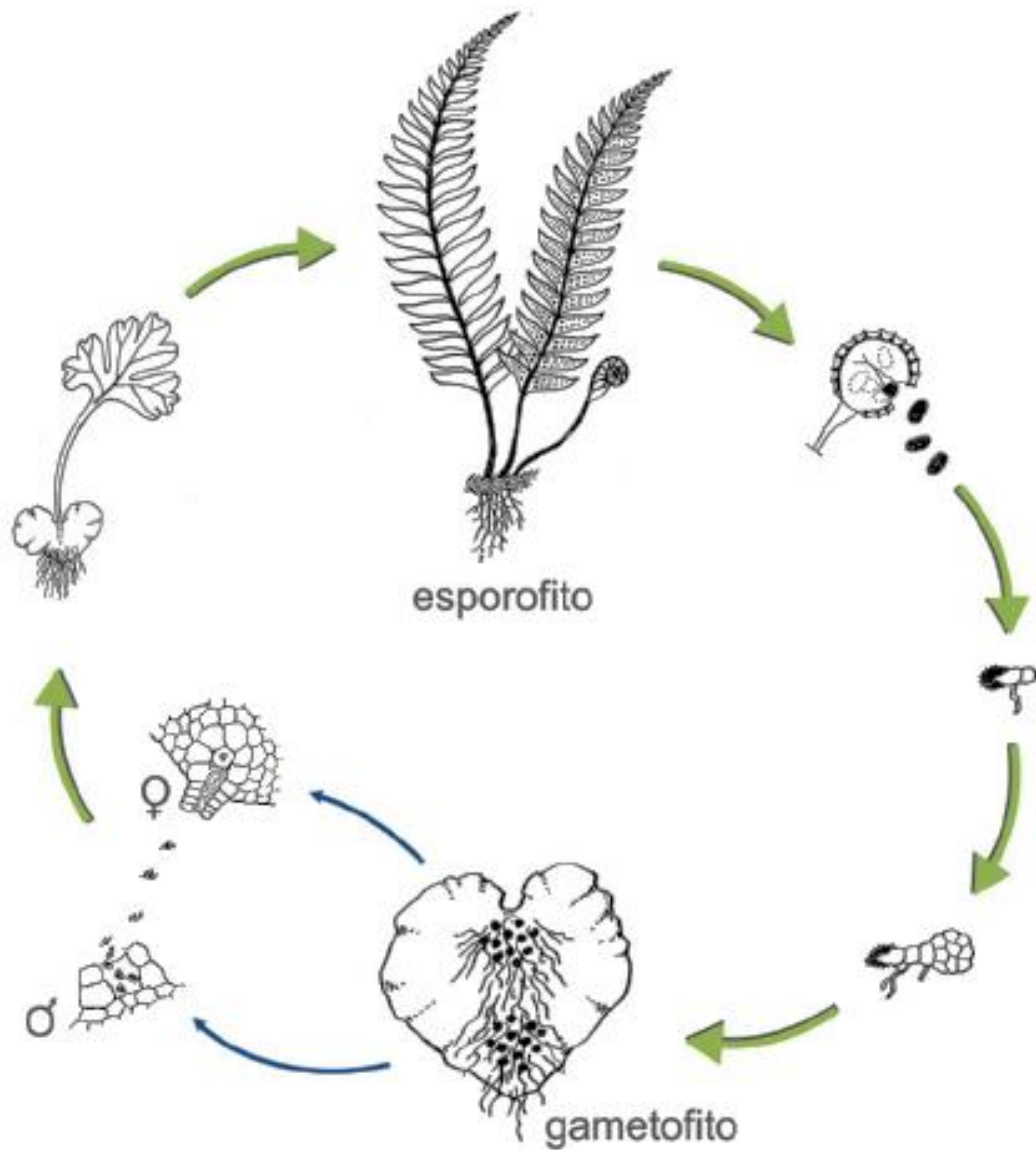


Figura 3. Autofecundación intragametofítica. (Tomado de Martínez *et al.*, 2012).

Propágulos

Constituyen un método de reproducción vegetativa, ocurre con frecuencia en aquellos helechos que colonizan nuevos hábitats y soportan condiciones ecológicas extremas (Parker, 2010).

Aposporia

Formación de un gametofito sin producción de esporas, suprimiéndose la meiosis (apomeiosis), y el gametofito apospórico se desarrolla directamente a partir del esporofito (ocurre en *Athyrium filix-femina*) que en lugar de esporangios, se originan prótalos con anteridios y arquegonios, diploides y que no son funcionales (Parker, 2010).

Apogamia

Formación de esporofitos a partir de gametofitos sin previa fecundación (*Dryopteris*, *Asplenium*) la cuarta división del arqueosporio no es normal, los núcleos entran en profase y luego metafase y consiguiente duplicación de cromosomas manteniendo los núcleos con dotación tetrapolide, se forman solo 8 células madres de las esporas, la posterior meiosis origina 32 diplosomas, los prótalos originados sólo tienen anteridios y a partir de células de la escotadura se forma un embrión apogámico, sin pie y con continuidad histológica con el gametofito (en la reproducción sexual normal el arqueosporio se divide 4 veces originando 16 células que sufrirán meiosis y darán 64 esporas haploides) (Parker, 2010).

Helechos eusporangiados

El cigoto que sufre una primera división transversal, aparece orientado presentando una polaridad célula epibasal, el polo apical, originará el eje de la célula hipobasal. La

orientación puede ser, orientación endoscópica, polo apical incluido en el vientre, polo basal orientado hacia el cuello (Isoetes, Marattiales) orientación exoscópica, polo apical hacia el cuello del arquegonio (Parker, 2010).

Helechos leptosporangiados

En la primera división del cigoto vertical, el embrión se desarrolla horizontalmente, el polo apical se dirige hacia el ápice del prótalo, en la segunda división vertical y perpendicular a la precedente tercera división transversal, y hay en total 8 células que originarán los órganos del esporofito, las dos células anteriores más próximas al cuello darán lugar a la primera hoja (cotiledón) las otras dos células anteriores originarán el tallo en las células posteriores más próximas al cuello que dan origen a la raíz, y las otras dos células posteriores al pie (Parker, 2010).

Ciclo biológico de los helechos

El esporofito o helecho adulto es la planta productora de esporas. Estas se encuentran en la parte inferior de las frondas en unas estructuras denominadas soros. Cuando estos se abren se liberan las esporas, que se desplazan con ayuda del viento y del agua, germinando en lugares con condiciones adecuadas de humedad alta y suficiente luz.

Pasadas varias semanas, en las esporas se forma un pequeño rizoma que las mantiene agarradas al suelo, posteriormente esta célula se divide hasta formar una estructura plana y pequeña en forma de corazón llamado prótalo donde se desarrollaran los órganos femeninos y masculinos. Los órganos masculinos se llaman anteridios, se encuentran en la parte inferior del prótalo y contienen anterozoides. Los órganos reproductivos femeninos se llaman arquegonios y contienen un huevo. Cuando existe agua suficiente en el

ambiente, los anteridios liberan anterozoides, que nadan hasta llegar al huevo fertilizándolo, este huevo fertilizado (cigoto) se divide y forma un embrión o un esporofito joven que desarrolla raíces estípites y hojas.

A medida de que crecen las raíces, el prótalo es absorbido por el crecimiento del esporofito, observándose finalmente un pequeño helecho. La duración del ciclo biológico puede variar entre cinco meses y un año, desde la liberación de la esporas hasta la formación de un pequeño helecho (Salinero y González-García, 2009) (Figura 4).

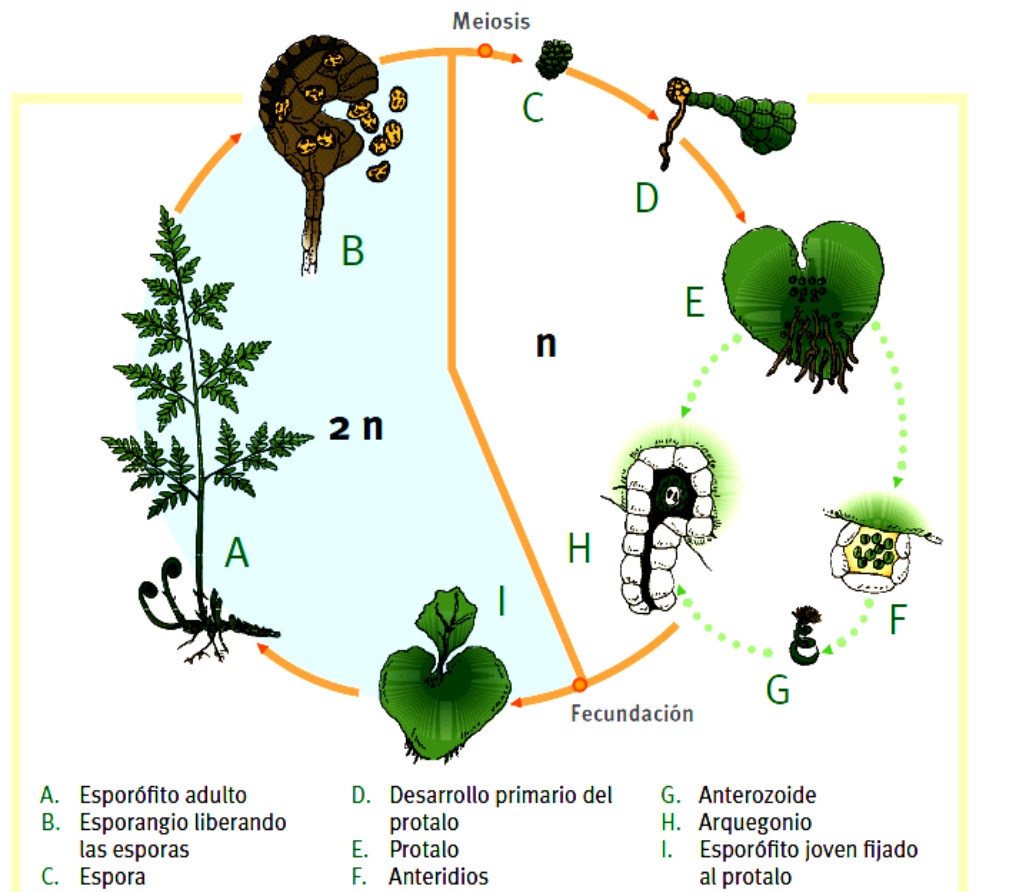


Figura 4. Ciclo de alternancia de generaciones de un helecho. Tomado de: Delgado y Plaza, 2010.

Descripción botánica de la familia Cyatheaceae

Terrestres o raramente epifitas, generalmente arborescentes, raramente acaules; hojas generalmente 1-5 m, monomorfas; lamina 1-4 pinnada, más comúnmente 2-pínnado-pinnatífida, sin yemas el ápice pinnatífido o similar en forma a las pintas laterales; peciolo escamoso, por lo menos basalmente nervaduras libres o el par basal unido para formar areolas costales; ejes de las láminas generalmente pelosos y escamosos abaxialmente; soros superficiales indusiados o no, receptáculo elevado, globoso o subcilíndrico; esporangios en apariencias sésiles pero realmente con un pedículo corto de 4 hileras de células, las cápsulas esporangiales a menudo algo angulares y óbconicas, el anillo oblicuo y no interrumpido en el pedículo esporas tetraédricas o globosas, aclorofílicas 16, 32, o 64 por esporangio; $x = 69$. 4 gen aprox. 500 spp. Trópicos (Tyron 1970; Smith *et al.*, 2006).

Las Cyatheaceae son típicamente arborescentes con grandes hojas en el ápice del tallo. Se caracterizan además por los soros en el envés de la lámina, los receptáculos elevados y globosos o subcilíndricos y el ápice de los tallos y las bases de los peciolos pelosos. Las Cyatheaceae son notablemente uniformes en tener $x = 69$ (Tyron 1970).

Descripción botánica de la especie

Cyathea bicrenata Liebmann es un helecho arborescente que en la parte basal forma una capa gruesa de raíces adventicias conocida comúnmente como “maquique”, peciolos estramineos a café claro con espinas de 1-5 mm de largo, tricomas densos; escamas de color café con margen claro, de 5-6 mm de ancho, frondas de 2.5-4 m de largo, bipinnadas pinnatífidas con los segmentos profundamente lobulados, pinnas sésiles con peciolo de menos de 1 cm de largo; pínulas sésiles de 2.2-3 cm de ancho segmentos ascendentes,

escamas buliformes en la base de los segmentos, tricomas sobre las venas medias en la parte abaxial de los segmentos tricomas en la parte adaxial, tejido laminar entre las nervaduras glabro o peloso; soros medios, sin indusio, parafisos más cortos que los esporangios (Mickel y Smith, 2004) (Figuras 5 y 6).



Figura 5. *Cyathea bicrenata*



Figura 6. Soros de *Cyathea bicrenata*

Distribución de *Cyathea bicrenata*

Esta especie se encuentra en los siguientes países: Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y Venezuela (Figura 7).



Figura 7. Distribución geográfica de *C. bicrenata*. Tomado de: <http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/>

Tipo de espora

Las plantas de la familia Cyatheaceae son homospóricas, es decir, tienen esporas del mismo tipo, forma y tamaño, que al germinar originan gametofitos bisexuales. Las esporas son no clorofílicas, con viabilidad larga, triletes, tetraédricas, unicelulares con proplastidios y glóbulos de grasa que funcionan como reserva. El contenido protoplásmico está rodeado por una capa externa, gruesa, impermeable con diversa ornamentación llamada exina, la cual está constituida por esporopoleina (politerpeno de gran resistencia también encontrado en el polen) y una capa interna o intina formada de celulosa la cual es impermeable al agua (Pérez-García, 1989) (Figura 8).

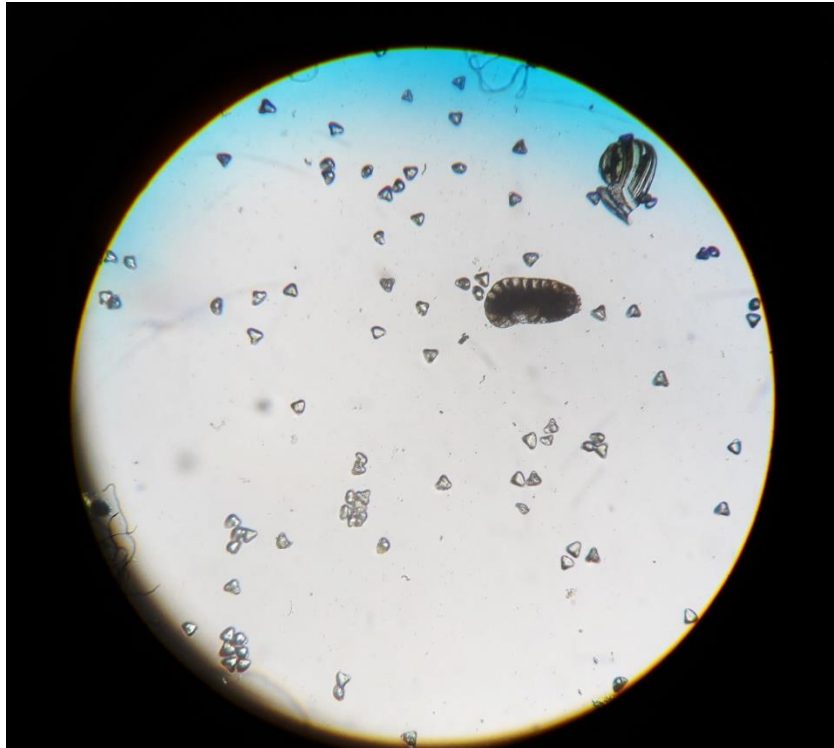


Figura 8. Esporas y esporangio de *Cyathea bicrenata* vistas con un objetivo de 20x

Germinación

El primer paso en la germinación de esporas de los helechos es la imbibición. Esto permite que los contenidos de la spora se puedan rehidratar, en particular los gránulos de almacenamiento y la cromatina. Para inducir la germinación de las esporas, deben estar sobre una superficie húmeda, con luz y condición de temperatura favorable, rodeado de una atmósfera cercana al punto de saturación de humedad. Las esporas más viables germinarán en unos pocos días a unas pocas semanas, dependiendo de la especie. En esporas no verdes, la energía para la germinación viene inicialmente de la hidrólisis de las proteínas de almacenamiento a moléculas más simples (Raghavan, 1989).

Patrón de germinación

En la familia Cyatheaceae, el letargo de las esporas termina cuando comienzan a germinar, empleando los lípidos, proteínas y almidón almacenados. La germinación es precedida por el hinchamiento de las esporas ocasionado por la absorción del agua. La intina se expande y la exina se abre por las lesuras, permitiendo la salida de la primera célula rizoidal. Posteriormente, inicia la primera división celular, formando una pared paralela al eje polar de la espora. La segunda división (en la célula inicial protálica) es perpendicular a la primera y las divisiones subsecuentes son paralelas a ella. A este patrón de germinación se le conoce como tipo *Cyathea*.

El desarrollo del prótalo es del tipo *Adiantum* o *Drynaria*, caracterizado por la formación de una célula meristemática cuando el talo tiene de 4 a 5 células de ancho. Los anteridios y arquegonios se forman en el mismo prótalo, aunque algunas veces los talos son estrictamente femeninos y otros masculinos (Pérez-García, 1989).

Sustratos

Un sustrato es cualquier medio que se utilice para el cultivo de plantas en contenedores, donde se entiende por contenedor cualquier recipiente que tenga altura limitada. Abad-Berjón *et al.* (2004) señalan que sustrato es todo material sólido distinto del suelo *in situ*, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta y que este puede intervenir o no en la nutrición vegetal.

Las esporas deben ser sembradas en un medio apropiado para que haya una exitosa germinación. El medio debe ser un material como el musgo de turba o musgo *Sphagnum* finamente molido, cuando la espora germina, debe tener fácil acceso a un sustrato húmedo con el fin de establecerse. Los cultivadores comerciales en Australia utilizan una mezcla de musgo de turba, ya sea mezclada con arena, grava fina o perlita (Goudey, 1985).

Esterilización de sustratos

La esterilización de los sustratos es requerida antes de la siembra para evitar la contaminación por musgos invasivos, hongos y algas, así como los insectos nocivos. Esto se realiza comúnmente usando agua hirviendo, microondas o al vapor. La temperatura del agua de los sustratos debe ser elevada, aproximadamente a 95 °C y se mantiene a esa temperatura durante aproximadamente 30 minutos. El aumento de la temperatura más alta debe evitarse ya que puede destruir las bacterias beneficiosas (Goudey, 1985).

Siembra de las esporas

Las esporas se dispersan en la superficie de los sustratos. Para obtener los mejores resultados, no se deben aplicar capas demasiado gruesas, de lo contrario las esporas no se desarrollarán adecuadamente debido al hacinamiento. También los prótalos crecerán hacia arriba, hacia la luz (Hoshizaki y Moran 2001).

Una vez que las esporas se han sembrado, el contenedor deberá cubrirse inmediatamente con un trozo limpio esterilizado de vidrio o plástico transparente o en su defecto un domo de plástico transparente. Debe marcarse con detalles la especie de helecho, el lugar de recolecta de las esporas, y la fecha. Un tratamiento de oscuridad durante 14 días después

de la siembra, antes de la exposición a la luz dará resultados de la sincronización del desarrollo, asegurando así, gametofitos que se desarrollarán al mismo tiempo (Gantt *et al.*, 1965).

Humedad

Se requiere una alta humedad del sustrato para que las esporas se puedan imbibir. El gametofito desarrolla primero las raíces delgadas como cabellos (rizoides) para anclar al sustrato y que es un mecanismo para obtener la humedad y los nutrientes. Se requiere humedad constante para asegurar estas diminutas estructuras y que puedan acceder a la humedad y evitar que se sequen. Si el medio se humedeció a fondo y la plantación ha sido cubierta, el riego debe ser innecesaria después de la siembra. A pesar de ello, se puede añadir agua a través de la parte inferior del recipiente colocándolo en una estera capilar o en un recipiente poco profundo si es necesario (Hoshizaki y Moran 2001).

Una vez que los prótalos han desarrollado, requieren de nebulización con agua. Esto proporciona una película de agua que permite que los espermatozoides móviles viajen al arquegonio. El esperma fertiliza el huevo, la producción de un cigoto, a continuación, un embrión. Esto luego se convierte en el esporofito (Hoshizaki y Moran 2001).

Nutrición

Se requieren nutrientes para todos los procesos en el crecimiento y desarrollo del prótalo así como la formación esporofito (Fernández *et al.* 1997) (Fernández *et al.* 1996). Las esporas son similar a las semillas, ya que contiene un suministro de alimentos inicial en forma de gránulos de proteína. Los rizoides anclan los prótalos al sustrato, y de esa manera extraen los nutrientes del medio.

Los prótalos se pueden beneficiar en el crecimiento y desarrollo de la aplicación regular de fertilizantes. Dado que los prótalos son muy pequeños y delgados (una sola molécula de espesor en algunos casos) la concentración de fertilizante nitrogenado se aplicará semanal o quincenal para maximizar su eficacia (Goudey 1985).

La adición de hormonas vegetales o solución de sacarosa, azúcar o glucosa puede ser beneficioso en la germinación de esporas. El ácido indolacético se encuentra en los meristemas de la prótalos, y la adición de una solución débil de los medios puede ser beneficioso para el desarrollo de gametofitos (Hoshizaki y Moran 2001). La adición de azúcares debe realizarse con cuidado, ya que el exceso de azúcar es fitotóxico a prótalos y aumenta la velocidad de envejecimiento de los tejidos de la planta. También puede dar lugar a la contaminación por hongos o algas (Fernández *et al.*, 1999).

LITERATURA CITADA

- Abad-Berjón M, Noguera-Murray P, Carrión-Benedito C. 2004.** Los sustratos en los cultivos sin suelo. En: Urrestarazu-Gavilán. Cultivo sin suelo. Madrid: Mundi Prensa. 113-158.
- Alarcón-Rojas, N y Peláez-Peláez, F. 2008.** Efecto de la luz y la temperatura en la germinación de esporas de *Pteris vittata* (Pteridaceae). Rebiol. 28:2.
- Álvarez-Zúñiga, E. A. Sánchez-González, L. López-Mata y J. Tejero-Díez. 2012.** Composición y abundancia de las pteridofitas en el bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. Botanical Sciences. 90 (2): 163-177.
- Banks, A. J. 1999.** Gametophyte development in ferns. Annu. Rev. Plant Physiol. 50: 163-186.
- Ballesteros, D. 2010.** Conservation of fern spores. En H. Fernandez, A. Kumar y M.A. Revilla (Eds.), Working with Ferns: Issues and Applications. (1a ed., 155-172), Nueva York, E.E.U.U. Springer science.
- Cassanego, M.B.B., Droste, A. y Windisch, P.G. 2010.** Effects of 2, 4-D on the germination of megaspores and initial development of *Regnellidium diphyllum* Lindman (Monilophyta, Marsileaceae). Brazilian Journal of Biology, vol. 70, no. 2, p. 361-366.
- Delgado, A. y Plaza, I. 2010.** Helechos amenazados de Andalucía: avances en conservación. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla, 128 pp.

- Dyer, A.F. 1979.** The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In DYER, AF. (Ed.). The experimental biology of ferns. London: Academic Press, p. 253-305.
- Fernández, H. Bertrand, A. M. y Sánchez-Tamés R. 1996.** Influence of tissue culture conditions on apogamy in *Dryopteris affinis* sp. *affinis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45: 93–97.
- Fernández, H. Bertrand, A. R. Sánchez-Tamés R. 1997.** Germination in cultured gametophytes of *Osmunda regalis*. Plant Cell Rep. 16: 358–362.
- Fernández, H. Bertrand, A. y R. Sánchez-Tamés. 1999.** Biological and nutritional aspects involved in fern multiplication. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 211–214.
- Goller, K, Ryczynski, J. J. 1995.** *In vitro* culture used for woody fern *Cyathea australis* (R. Br.) Domin vegetative propagation. Acta Soc. Bot. Pol. 64(1):13-17.
- Goudey, C.J. 1985.** Maidenhair ferns in cultivation, Lothian Publishing Company Pty. Ltd., Melbourne, Australia.
- Hoshizaki, B. J. y Moran, R.C. 2001.** Fern Growers Manual, Timber Press, Portland, Oregon USA.
- Kato, Y. 1976.** The effect of freezing and organic solvents on viability of chlorophyllous fern spores. Cytologia 41:387–393.
- Lindsay, S., Sheffield E., y Dyer A.F., 1992.** Soil spore banks, fern conservation and isozyme analysis. In: Ide J.M., Jermy A.C. & Paul A.L. (eds). Fern horticulture: past, present and future perspectives. Intercept, Andover, UK. pp. 279- 283.

Luna-Vega, I., Alcántara-Ayala, O., Ruíz-Jiménez, C.A. Contreras-Medina, R. 2006.

Ecology and conservation of neotropical montane oak forests. En: Kappelle, M., (ed.), Composition and structure of humid montane oak forests at different sites in central and eastern Mexico, pp.102-112, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Lloyd, R. M. y Klekowski, E. J. 1970. Spore germination and viability in pteridophyta:

Evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotropica* 2 (2): 129-137.

Martínez, O., Tanco, M., Chambi, J., Bonomo, M., Ramírez, M y Avilez, Z .2012. Sobre

la biología reproductiva de los helechos. *Temas BGNoa*. 2(2): 48-53.

Méndez, M. y Murillo, J. 2014. Helechos y Lycófitos de Santa María (Boyacá, Colombia).

Serie de Guías de Campo del Instituto de Ciencias Naturales No. 14. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Colombia, 152 p.

Menéndez V., Revilla MA, Bernard P, Gotor V, y H. Fernández. 2006. Gibberellins and

antheridiogen on sex in *Blechnum spicant* L. *Plant Cell Reports*. 25:1104–10.

Mickel J. T. y A. R. Smith. 2004. The Pteridophytes of Mexico. *Memoirs of The New York*

Botanical Garden. USA. 1054 pp.

Nester, E.J. y Coolbaugh, R.C., 1986. Factors influencing spores germination and early

gametophyte development in *Anemia mexicana* and *Anemia phyllitidis*. *Plant Physiology*.82: 230-235.

Nondorf, L., A Dooley, M Palmieri, y J Swatzell. 2003. The effects of pH, temperature,

light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri. *American Fern Journal* 93 (2): 56-69.

- Parker, S. 2010.** Ferns, mosses and others. Spore producing plants. Minneapolis, Minn. Compass Point Books.260p.
- Pérez, G. B y Reyes, J. L. 1993.** Helechos: propagación y conservación. Ciencias. No. 53.
- Pérez-García, B. 1989.** Morfogénesis de gametófitos de Cyatheaceae (Pteridophyta: Filicales). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 1-244 pp.
- Petersen, R. L. 1985.** Towards an appreciation of fern edaphic niche requirements. In Dyer, A.F. and Page, C.N. (Eds.). Biology of Pteridophytes. Edinburgh: The Royal Society of Edinburgh, p. 93-103.
- Prospero, B. F, Ferreira, C. C. E, Ferraz, M. L. A, Caetano, T. A. F, Nagal, V. 1990.** Propagação de pteridófitas *in vitro* a través de esporas. Bragantia, Campinas 49 (2): 205-219.
- Quintanilla, L. G. Amigo, J. Pangua, E. y Pajarón, S. 2002.** Effect of Storage Method on Spore Viability in Five Globally Threatened Fern Species, Annals of Botany 90: 461-467.
- Rainker T.A. y J.M.O. Geiger. 2008.** Population genetics. In: Biology and evolution of fern and licophytes, R.A. Ranker and C.H. Hauler, eds. Cambridge University Press, Cambridge, 175--198.
- Raghavan, V. 1989.** Developmental Biology of Fern Gameophytes, Cambridge University Press, New York.

- Roberts E.H.1973.** Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Salinero, C. y González-García, M. 2009.** Helechos arborescentes. *EFA* 36/05.
- Smith A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H. y Wolf, P. G. 2006.**
A classification for extant ferns. *Taxon*, 55: 705–731.
- Takahashi, N., Hashino, M., Kami, C. e Imaichi, R. 2009.** Developmental morphology of strap-shaped gametophytes of *Colysis decurrens*: a new look at meristem development and function in fern gametophytes. *Annals of Botany*. 104(7): 1353-1361.
- Troncoso de Arce, A., M. Cantos Barragán y Liñán Benjumea, J. 2004.** Conservación de plantas de interés forestal. *Investigación y Ciencia*. Edición Española de *Scientific American*. No. 335.
- Tyron, R. 1970.** Development and evolution of ferns floras of Oceanic Islands. *Biotropica*. 2:76-84.
- Viviani, D. y Randi, A.M. 2008.** Effects of pH, temperature and light intensity on spore germination and growth analysis of young sporophytes of *Polypodium lepidopteris* (Pteridophyta, Polypodiaceae). *Rodriguesia*, vol. 59, no. 4, p. 751-760.
- Whittier, D.P. y Moyroud, R. 1993.** The promotion of spore germination and gametophyte development in *Ophioglossum palmatum* by low pH. *American Fern Journal*. 83(2): 41-46.

CAPITULO II

PROTOCOLO PARA LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Cyathea bicrenata* LIEBM. EN CULTIVO *IN VITRO*

RESUMEN

Los helechos forman parte de las especies que habitan los bosques húmedos de montaña (BHM). En este tipo de vegetación, existen helechos arborescentes que desempeñan funciones ecológicas relevantes. México cuenta con 14 especies, la mayor riqueza de especies registradas de helechos arborescentes. La disminución de las poblaciones de *Cyathea bicrenata* Liebmann han contribuido a su clasificación en la NOM-059-SEMARNAT-2010, como especie en riesgo de extinción. Entre los factores que han mermado las poblaciones de esta especie, están la recolecta ilegal. La germinación de las esporas es una opción que ha tomado auge, con resultados muy notables en la propagación de especies en riesgo. El objetivo de este trabajo fue generar un protocolo para la germinación *in vitro* de esporas de *C. bicrenata*, con el fin de obtener esporofitos para su conservación como especie con protección especial (Pr). Se optimizó el pH entre un intervalo de 4 a 6.5, la concentración de NaOCl al 0.02, 0.04, 0.06, 1, 2, 35 y 50 % y tiempo de desinfección de 5, 10, 15 y 20 min. Las esporas fueron cultivadas en medio de Murashige y Skoog (concentración al 100 %). Para la estimación del índice de germinación, se utilizaron escalas del método de Braun Blanquet. Se concluyó que el mejor desinfectante de esporas de *C. bicrenata* fue el NaOCl al 35 % con tiempo de exposición de 5 y 10 minutos. En estos tiempos de exposición se presentó una exitosa germinación.

Palabras clave: *Cyathea bicrenata*, esporas, gametofito, germinación, método Dyer, conservación *ex situ*, medio MS, NaOCl, pH.

INTRODUCCIÓN

En México y en el mundo, la mayor riqueza de especies de helechos se encuentra en la zona ecológica templada húmeda, entre los 1000 y 2000 msnm, área que incluye al bosque mesófilo (BMM) (Kluge *et al.*, 2006; Carvajal-Hernández y Krömer, 2015). Los helechos arborescentes constituyen un componente conspicuo del bosque húmedo de montaña (también conocido como bosque mesófilo de montaña) de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Pérez *et al.*, 2014). Este tipo de vegetación, desempeña funciones ecológicas relevantes, por ejemplo, sus rizomas aéreos son excelentes forofitos de otras especies de helechos, algunos de los cuales son indicadores de ecosistemas en buen estado de conservación (p. ej. las familias Grammitidaceae e Hymenophyllaceae) (Álvarez *et al.*, 2012, Krömer *et al.*, 2013; Armenta-Montero *et al.*, 2015). Se tienen registros de cuatro familias de helechos arborescentes en México: Cibotaceae, Cyatheaceae, Dicksoniaceae y Lophosoriaceae, representadas por 16 especies (Mickel y Smith, 2004).

Cyathea bicrenata es una especie de helecho arborescente que se distribuye en algunos países de América, como Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y Venezuela (Moran 2003, Grandtner y Chevrette 2013). En México se encuentra presente en los estados de Guerrero, Hidalgo, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz (Mickel y Smith, 2004., Mehltreter y García-Franco 2008, García-Mendoza y Meave, 2011, Vázquez *et al.*, 2012, Villaseñor *et al.*, 2013, Carvajal *et al.*, 2014) y está sujeta a protección especial según la norma NOM-059-SEMARNAT-2010, que se encuentra en el marco de la legislación mexicana encargada de la protección ambiental. La disminución de las poblaciones de *C. bicrenata* se asocia a varias causas: i) la

reducción de su hábitat ii) la extracción ilegal de la planta, para fines de ornato y; iii) la explotación del “maquique”, que es la capa de raíces adventicias desarrolladas alrededor del tallo, que es utilizado para realizar artesanías como macetas o sustratos de orquídeas y otros helechos herbáceos (Palacios y Flores, 1992). *Cyathea bicrenata* en su ambiente natural produce una gran cantidad de esporas, 69 esporas por soro (Riba, 1981). A pesar del potencial éxito reproductivo reflejado en la cantidad de esporas, en recorridos *in situ* en zonas de Hidalgo, se ha observado que las poblaciones se encuentran representadas por pocos individuos aislados. En su ambiente natural los gametofitos desarrollados son muy sensibles a los cambios de humedad ambiental, así como a la competitividad por nutrientes y espacio, lo que disminuye el número de individuos que llegan a la etapa adulta (Palacios y Flores 1992, Riaño *et al.*, 2015).

Varios autores han abordado el cómo conservar o restaurar la riqueza genética, que junto con las especies y los ecosistemas conforman la biodiversidad. La micropropagación es otra opción que ha tomado auge, teniendo resultados muy notables en la propagación de especies con estatus en posible riesgo de extinción (Rodríguez-Trejo, 2005).

La germinación de las esporas en cultivo *in vitro* es una opción que ha permitido obtener numerosos gametofitos. Este método proporciona condiciones controladas para la propagación de esporofitos y el estudio de la biología de las especies. Se han realizado numerosos métodos de desinfección de esporas de helechos. Algunos han arrojado resultados exitosos; sin embargo, existe una pérdida significativa de esporas durante el proceso de desinfección, o por contaminación del medio donde se cultivan las esporas, o la mayoría de los métodos son de arduo procedimiento. Muchos de estos métodos son todavía ineficientes en términos de tiempo y pérdida de esporas. El método de

propagación debe ser específico para cada género o especie tomando en cuenta los factores externos que pueden provocar contaminación, se debe tomar en cuenta la viabilidad de la especie, el tiempo de almacenamiento, la concentración y el tipo de desinfectante. Es por ello que este trabajo tiene como objetivo establecer un protocolo adecuado y simple para el desarrollo de esporas *Cyathea bicrenata* que son extraídos del medio silvestre y que se pretenden cultivar *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Sitio de colecta

La recolecta de frondas de *C. bicrenata* se realizó a la orilla de la carretera México-Tampico, en septiembre de 2014, en la localidad de Tlanchinol, Hgo. Se registró la ubicación geográfica del punto de muestreo a 20° 55' 06" N y 98° 41' 55" E con una altura de 1476 msnm.

Obtención de material biológico

Se colectaron frondas fértiles, las cuales se colocaron en hojas de papel periódico. Se guardaron a temperatura ambiente a 24 °C ± 4 °C durante tres semanas, hasta que se observó dehiscencia de los esporangios que liberaron las esporas. Posteriormente, se tamizaron en una malla de 62 µm.

Desinfección de esporas

Se utilizaron tres métodos de desinfección. 1) el método para la desinfección de esporas de helechos de Dyer (1979) fue modificado, y consistió en pesar 50 mg de esporas que fueron depositadas en tubos previamente esterilizados a los que se le añadieron 25 ml de solución de benomil (1.5 g L⁻¹) el tubo se colocó en una centrifuga Damon/ IEC modelo

41125 a 1500 rpm durante 5 minutos, posteriormente, se utilizó una solución de NaOCl (distintas concentraciones) más dos gotas de tween 80 y tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 min. Se hicieron tres lavados con agua destilada esterilizada. 2) el método de Ford (1992) consistió en pesar 50 mg de esporas que se colocaron en paquetes hechos con discos de papel filtro Whatman del número 40 que fueron depositados en viales especiales de centrifuga previamente esterilizados, se añadieron 25 ml de solución de benomil (1.5 g L⁻¹), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Consecutivamente se utilizó una solución de NaOCl con dos gotas de tween 80 usando las concentraciones del NaOCl que se muestran el cuadro 1. Se hicieron tres lavados con agua desionizada esterilizada. 3) el tercer método empleado fue el de aspersion de etanol, que consistió en pesar 50 mg de esporas mismas que fueron depositadas en discos de papel filtro esterilizado. Se asperjó etanol al 96 % durante 30 minutos.

Una vez desinfectadas las esporas con los tres tratamientos de desinfección se cultivaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de Murashige y Skoog (1962) al 100 % con pH ajustado con HCl y NaOH al 1N: 4.0 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5. Las cajas de Petri se sellaron con plástico. El experimento se mantuvo en un cuarto de incubación con una temperatura de 24 °C ± 4 °C, con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones (cajas de Petri) por tratamiento.

Cuadro 1. Concentración de NaOCl y etanol en diferentes tiempos de exposición en desinfectantes utilizados en las esporas de *C. bicrenata*.

Método de Dyer (1979) (modificado) Concentración de NaOCl (%)				Método de Ford (1992) (modificado) Concentración de NaOCl (%) (utilización de papel filtro whatman)				Método por aspersión de etanol Etanol (%)
Tiempo de exposición min				Tiempo de exposición min				Tiempo de exposición min
5	10	15	20	5	10	15	20	30
	0.02				0.02			96
	0.04				0.04			
	0.06				0.06			
	1				1			
	2				2			
	35				50			
	50							

VARIABLES EVALUADAS

Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación se estimó en cada caja de Petri se utilizaron los rangos empleados en la escala de Braun-Blanquet (1979), según la metodología utilizada por Narváez *et al.* (2013) y Ruíz *et al.* (2015), que consistió en evaluar de manera indirecta según el grado de cobertura de gametofitos desarrollados en la caja de Petri. Se consideró un intervalo de valores de 1 a 5. Donde: 1 = cobertura menor al 5 %; 2 = cobertura del 5 al 25 %; 3 =cobertura del 25 al 50 %; 4 = cobertura del 50 al 75 % y 5 = cobertura igual o superior al 75 %. Se estimó el porcentaje por medio de los rangos empleados (1 a 5) según la escala de Braun Blanquet y se obtuvo la mediana de frecuencias.

Desarrollo del gametofito

Para evaluar el desarrollo de la espora hasta la fase de gametofito, se cultivaron las esporas en 20 ml del medio de Murashige y Skoog (1962) con pH a 5.7 (ajustado con solución de HCl y NaOH al 1N) en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (24 repeticiones).

El método utilizado para la desinfección de las esporas fue el Dyer (1979), con una concentración de NaOCl al 35 % con un tiempo de exposición de 5 min.

Durante los primeros 43 días, cada semana se observaron en un microscopio invertido (marca Zeiss Primo vert) 20 gotas de medio MS de cada una de cuatro repeticiones, por semana colocando cada gota en un portaobjetos y encima de éste un cubreobjetos. Se hicieron observaciones con el objetivo de 40x y 20x después de 30 días. Se dio un seguimiento de su desarrollo desde la fase de espora hasta la formación del gametofito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mejor método para la desinfección de las esporas, sin dañar su viabilidad y sin contaminación fue el método de Dyer modificado por los autores (1992), con una concentración de NaOCl al 35 % en los tiempos de exposición de 5 y 10 minutos. Es importante mencionar que con este mismo método pero con tiempos de exposición de 15 y 20 minutos no existió contaminación del medio; sin embargo, hubo daño en la viabilidad de las esporas, por lo tanto no existió germinación. Narváez *et al.*, (2013) indican que la exposición de las esporas a tiempos prolongados con agentes desinfectantes puede alterar la composición química de la pared celular y la membrana, por lo tanto la germinación. En el método de Ford (1979) modificado hubo presencia de germinación de esporas pero también hubo expresión de bacterias y hongos en el medio. Vargas y Droste (2014) realizaron un estudio de desinfección de esporas de *Cyathea atrovirens*, los autores esterilizaron las esporas con 0.5, 0.8 y 2 % de hipoclorito de sodio (NaOCl) durante 15 minutos. Ellos mencionan que existió contaminación en todos los cultivos. Sin embargo, el

porcentaje más alto de gametofitos, lo observaron en el tratamiento con 2 % de NaOCl, aunque sin diferencia significativa con los otros tratamientos con este agente de esterilización.

La germinación también depende de la aplicación de soluciones desinfectantes, lo que puede afectar su viabilidad y poder de germinación (Narvaéz *et al.*, 2013). Se han realizado estudios en los que se han sembrado esporas de pteridófitos, se ha procedido a la desinfección de éstas con diferentes sustancias, para eliminar o reducir las contaminaciones producidas por hongos y bacterias. Sin embargo, en diversos estudios se indica que la esterilización química de esporas afecta a su viabilidad (Simabukuro *et al.*, 1998), por lo que este aspecto debe ser tenido en cuenta, si se pretende conservar material sin mermar su capacidad de germinación.

Hua *et al.* (2009) diseñaron el método del “filtro” para la desinfección de esporas de helechos de *Adiantum reniforme* var. *sinense*, con dos tipos de desinfectantes: $HgCl_2$ y el NaOCl y concluyeron que el mejor desinfectante fue el NaOCl. Esterilizaron las esporas en paquetes, reportaron que no hubo pérdida mayor de esporas, debido a que la mayoría de las esporas se mantuvieron dentro de los paquetes; sin embargo, dentro de los paquetes se formaron burbujas de aire, estas no se eliminaron por completo, no todas las esporas entran en contacto con el desinfectante y esto causa una alta tasa de contaminación de 36.7 % al utilizar NaOCl y 23.3 % cuando se utilizó $HgCl_2$. Estas observaciones coincidieron con los resultados de esta investigación, al utilizar los paquetes de papel filtro, donde no se reportó pérdida de esporas durante el proceso de desinfección, ya que las esporas se mantuvieron dentro de los paquetes de papel filtro.

Sin embargo, nuestros resultados reportan contaminación de hongos y bacterias al 100 % por ende se ve inhibida la germinación de esporas. A su vez también probaron un método de centrifugación similar al de Dyer (1979), donde se encontraron con la problemática de que las esporas libres en el vial tienden a caer cuando se vierte la solución de desinfectante y al realizar los lavados con el agua estéril. Es importante mencionar que sus resultados contrastan con esta investigación al reportar 0 % de contaminación. Recomiendan utilizar el método del “filtro”, porque las esporas se mantienen dentro del embudo del filtro durante todo el proceso de esterilización hasta su siembra. Así concluyen que la pérdida de esporas es mínima, no hay contaminación y se presentan los mayores porcentajes de germinación de 60.8 y 62.2 %.

En el método de aspersión de etanol no hubo germinación debido a que presentó contaminación del 100 % en todas las unidades experimentales. Caso contrario a lo que reportan Narváez *et al.* (2013) de que el método de aspersión de etanol no causó efectos adversos en el índice de germinación.

Los mejores resultados para la estimación de cobertura vegetal se obtuvieron conjugando tres variables: el tiempo de desinfección, la concentración de NaOCl y el pH, se logró los mejores resultados en pH de 5, con un tiempo de exposición de 5 min a una concentración de 35 % de NaOCl. Muchos helechos germinan y se desarrollan mejor en pH ligeramente ácido, con una temperatura de 25 °C, en condiciones húmedas (Nondorf *et al.*, 2003). Otto *et al.* (1984) observaron que la germinación y el desarrollo del gametofito son fuertemente afectados por el pH del medio. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gonçalves dos Santos *et al.* (2010) probaron escalas de pH de 4.0, 4.5, 5.0,

5.5, 6.0 y 6.7, en la germinación de esporas de *Gleichenella pectinata* (Willd.) y el mejor porcentaje de prótalos se observó en el pH de 4.5 y 5.0. Por otra parte la ausencia de germinación estuvo afectada por el pH, ya que con valores de 6.0 y 6.5 no existió germinación (Figura 1).

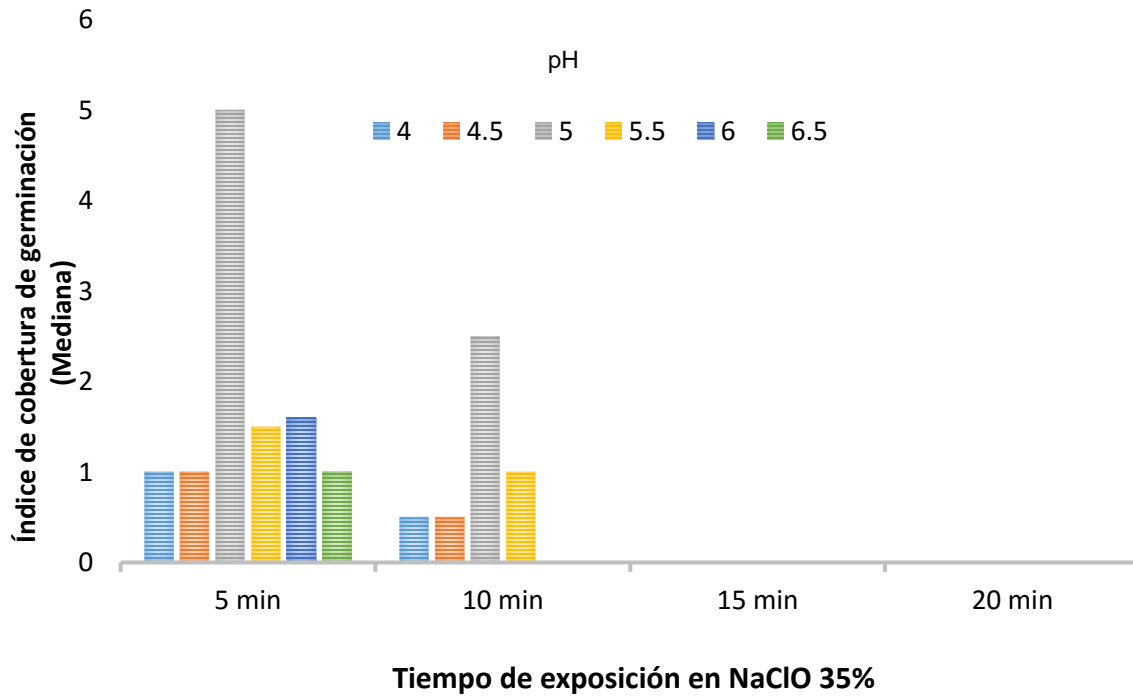


Figura 1. Porcentaje de germinación de esporas de *C. bicrenata*. En cuatro tiempos de exposición en NaOCl (35 %) a diferentes pH. Donde 1 = cobertura menor al 5 %; 2 = cobertura del 5 al 25 %; 3 = cobertura del 25 al 50 %; 4 = cobertura del 50 al 75 % y 5 = cobertura igual o superior al 75 %.

La germinación de las esporas de *C. bicrenata* se inició a los 30 días después de su cultivo y continuó hasta los 46 días. La germinación fue ecuatorial del tipo *Cyathea* donde dos células se forman en la germinación, una produce el rizoide y otra el filamento germinal, dando origen a filamentos cortos de dos a seis células (Nayar y Kaur, 1971, Pérez-García *et al.*, 1995). Narváez *et al.* (2013) reportan que los primeros indicios de

germinación de *Cyathea caracasana* se presentaron en un periodo de 18 a 22 días. El filamento germinativo de *C. bicrenata* es corto y puede presentar hasta tres rizoides (Figura 2b). A los 43 días hubo aparición de dos hileras de células que dan origen al prótalo (Figura 2c y 2d). A los 53 días se presentó la formación laminar. Dando lugar a la formación de un gametofito cordiforme (Figura 2e). El desarrollo del prótalo es del tipo *Adiantum* (Mendoza *et al.*, 1997), una célula meristemática se establece sólo cuando el talo tiene cuatro o cinco células de grosor.

La información generada en este estudio, en cuanto al desarrollo de la espora a la fase gametofítica, el pH óptimo, la concentración de NaOCl y el tiempo de exposición en el desinfectante. Se estableció el protocolo adecuado en la desinfección de esporas y el cultivo *in vitro* de *Cyathea bicrenata*. La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la recuperación de especies de helechos.

CONCLUSIONES

El mejor método para desinfectar las esporas sin dañar su viabilidad en el medio fue el método de Dyer (1979), con una concentración de NaOCl al 35 %.

El pH donde hubo mayor porcentaje de germinación fue el de 5, seguido por el de 5.5. Por lo cual se concluye que esta especie prefiere pH moderadamente ácido para la germinación y desarrollo de prótalo.

Este estudio sirve de base para la estandarización de las técnicas de propagación de esporas de especies de helechos arborescentes en peligro, lo cual es necesario para la conservación *ex situ* de las especies.

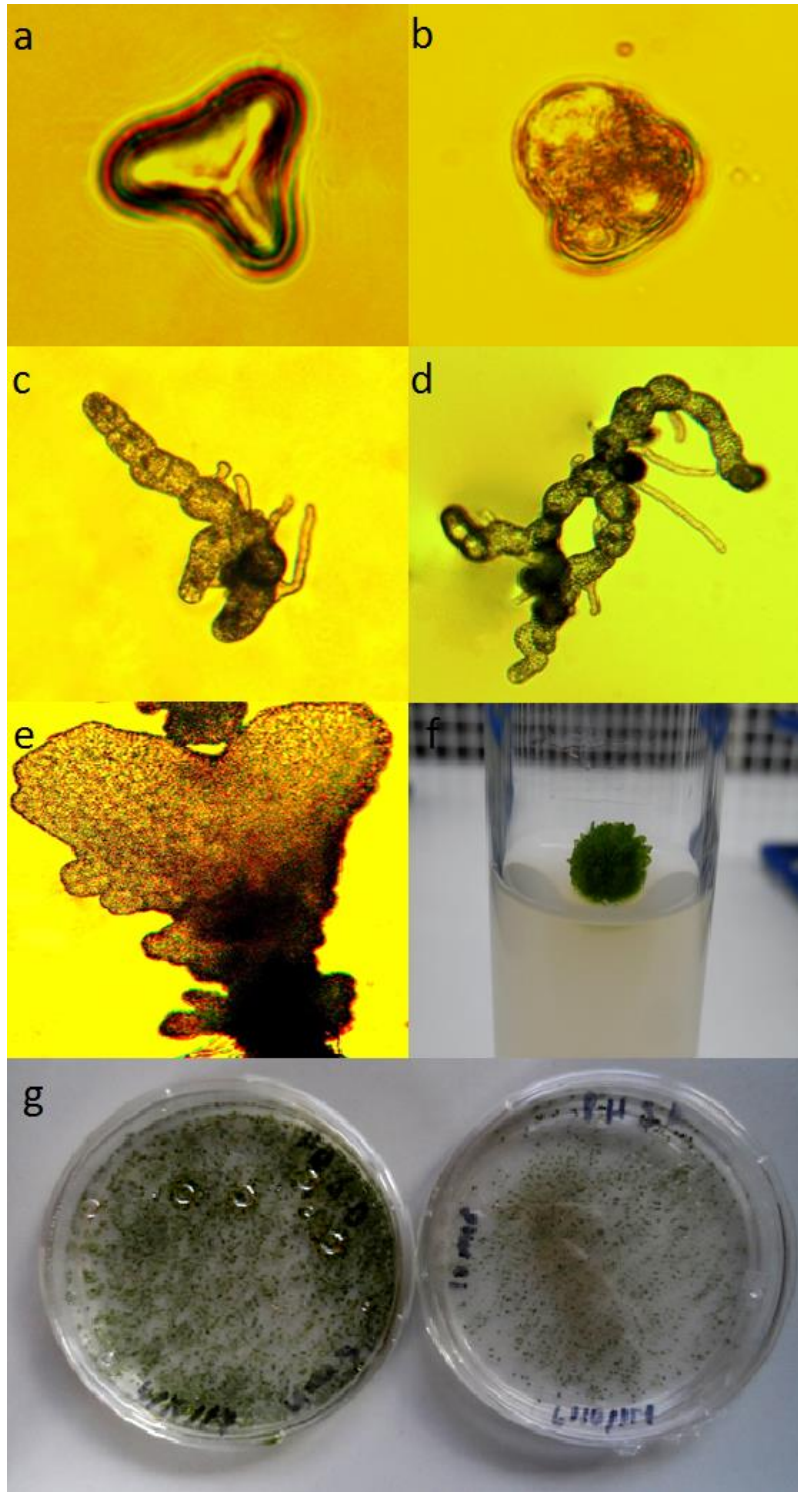


Figura 2: a) Espora trilete de *C. bicrenata* a los cuatro días de su establecimiento *in vitro* (40x) b) Espora germinada de *C. bicrenata* a los 30 días después de su cultivo (40x) c) Formación de rizoides y desarrollo de células de *C. bicrenata* a los 43 días después de su cultivo (20x) d) Elongación y formación de gametofito e) Prótalo a los 53 días f) Masa de gametofitos laminares en medio MS sólido g) Cultivo de esporas en medio MS con pH 5 en dos tiempos de desinfección izq. 5 minutos, der. 10 minutos.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, Z., L. Sánchez., J. López, D. Tejero. 2012.** Composición y abundancia de las pteridofitas en el bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. *Botanical Sciences* 90 (2): 163-177.
- Armenta-Montero, S., Carvajal-Hernández C.I., Ellis E.A. y Krömer T. 2015.** Distribution and conservation status of *Phlegmariurus* (Lycopodiaceae) in the state of Veracruz, Mexico. *Tropical Conservation Science* 8:114-137.
- Braun-Blanquet, J. 1979.** Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales. Blume, Madrid, España. 820 pp.
- Carvajal-Hernández, C., y T. Krömer. 2015.** Riqueza y distribución de helechos y licófitos en el gradiente altitudinal del Cofre de Perote, centro de Veracruz, México. *Botanical Sciences* 93:601-614.
- Carvajal- Hernández, C., T. Krömer y T. Vázquez. 2014.** Riqueza y composición florística de pteridobiontes en bosque mesófilo de montaña y ambientes asociados en el centro de Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 491-501.
- Dyer, A.F. 1979.** The culture of fern gametophytes for experimental investigation. *In* Dyer, A.F. (Ed). *The experimental biology of ferns*. London: Academic Press, pp: 253-305.
- García-Mendoza, A. J. y J. A. Meave. 2011.** Diversidad florística de Oaxaca: de musgos a angiospermas (colecciones y lista de especies). Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. 351 pp.

- Gonçalves dos Santos, E. P., Marques D. R., Santos, M y Randi, A. 2010.** Spore germination of *Gleichenella pectinata* (Willd.) Ching (Polypodiopsida-Gleicheniaceae) at different temperatures, levels of light and pH. Brazilian archives of biology and technology. 53(6):1309-1318.
- Grandtner, M. y J. Chevrette. 2013.** Dictionary of trees. Volume 2: South American, nomenclature, taxonomy and ecology. Academic Press Elsevier. Canada 466 pp.
- Hua, W., C Ping, Y Li, y C. Long. 2009.** An efficient method for surface sterilization and sowing fern spores *in vitro*. American Fern Journal 99(3):226–230.
- Kluge, J., M. Kessler y R. Dunn. 2006.** What drives elevational patterns of diversity? A test of geometric constraints, climate and species pool effects for pteridophytes on an elevational gradient in Costa Rica. Global Ecology and Biogeography 15: 358-371.
- Krömer, T., Acebey A. R., A. R. Smith. 2013.** Taxonomic update, distribution and conservation status of grammitid ferns (Polypodiaceae, Polypodiopsida) in Veracruz State, Mexico. Phytotaxa 82:29-44.
- Mendoza, A., B. Pérez-García y P. Reyes. 1997.** Morfogénesis de la fase sexual del helecho *Lophosoria quadripinnata* varo contracta (Lophosoriaceae). Revista Biología Tropical 45(3): 993-998.
- Mehltreter, K. y J. García-Franco. 2008.** Leaf phenology and trunk growth of the deciduous tree fern *Alsophila firma* (Baker) D. S. conant in a lower montane mexican forest. American Fern Journal 98(1):1-13.

- Mickel, J. T. y A. R. Smith. 2004.** The pteridophytes of Mexico. Memoirs of The New York Botanical Garden. USA. 1054 pp.
- Moran, R. 2003.** Low-Trunk epiphytic ferns on tree ferns versus angiosperms in Costa Rica. *Biotropica* 35(1): 48-56.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant.* 15: 473-497.
- Narváez, P., J Jerez., y S Mantilla. 2013.** Etapas de desarrollo *in vitro* del gametofito del helecho arborescente *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas* 11 (2):74-84.
- Nayar, B.K., y S Kaur. 1971.** Gametophytes of homosporous ferns. *Botanical Review* (Lancaster) 37:295-396
- Nondorf, L., A. Dooley, M. Palmieri, y J. Swatzell. 2003.** The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in *Cheilanthes feei* of Southeast Missouri. *American Fern Journal* 93 (2): 56-69.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT. 2010.** Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Otto, E.A., Crow, E J. y Kirby, H.G. 1984.** Effects of acidic growth conditions on spore germination and reproductive development in *Dryopteris marginalis*. *Annals of Botany*, 53(3):439-442.

- Palacios, R. y M. Flores.1992.** Notas sobre el maquique y cómo afecta su uso a los helechos arborescentes. Boletín de la Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. México. D.F. 92: 2-5.
- Pérez-García, B., M.E. Fraile y A. Mendoza. 1995.** Desarrollo del gametofito de *Lophosoria quadripinnata* (Filicales: Lophosoriaceae). Revista de Biología Tropical. 43:55-60.
- Pérez, P.G., S. González y D. Tejero. 2014.** Estructura poblacional y características del hábitat de dos especies de Cyatheaceae del estado de Hidalgo, México. Botanical Sciences 92 (2): 259-271.
- Riaño, K., O. Briones y B. Pérez-García. 2015.** Spore germination of three tree fern species in response to light, water potential, and canopy openness. American Fern Journal 105(2):59-72.
- Riba, R. 1981.** Flora de Veracruz. Cyatheaceae. INIREB. Xalapa, Veracruz. 43p.
- Rodríguez-Trejo, D. A. 2005.** Plantaciones forestales de restauración (enfoque biotecnológico). En: González, R. H y Jacinto, H. C. (Ed). Avances de Biotecnología Agropecuaria y Forestal en México. Asociación Nacional de Biotecnología Agropecuaria y forestal, pp: 245-251.
- Ruiz, R., M. Díaz y R. Gutiérrez. 2015.** Propagación *In Vitro* de *Platicerium andinum* Baker a partir de esporas. Revista ECIPerú 2 (1): 47-52.
- Simabukuro, E. A., L. Esteves y G. Felipe. 1998.** Analysis of a fern spore bank in Southeast Brazil. Hoehnea 25: 45-57.

Vargas, I. y A. Droste. 2014. *In vitro* propagation of *Cyathea atrovirens* (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions. *Revista Biología Tropical* 62 (1): 299-308.

Vázquez, T. M., C. Carvajal-Hernández., A. Aquino., S. Armenta y P. Frontini. 2012. Los helechos de Xalapa y sus alrededores. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 190p.

Villaseñor, J. L., E. Ortiz, L. Alvarado, M. Mora y G. Segura. 2013. Catálogo florístico taxonómico de los árboles de México. Informe final Proyecto JE012. Bases de datos SNIB-CONABIO. México, D. F.

CAPITULO III

GERMINACIÓN DE ESPORAS Y OBTENCIÓN DE PLANTULAS DE *Cyathea bicrenata* LIEBMANN EN DIFERENTES SUSTRATOS

RESUMEN

Cyathea bicrenata es una especie de helecho arborescente que crece en ecosistemas con alta humedad relativa, tal como es el bosque mesófilo de montaña (BMM). Esta especie se encuentra catalogada por la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de protección especial, debido a que las poblaciones silvestres son amenazadas por la tala, la extracción, por ser una planta de ornato, así como por el cambio de uso de suelo. La información que se conoce es que la propagación ocurre por esporas, lo que hace más difícil su multiplicación, desde la correcta obtención de las esporas, hasta el cuidado mismo del helecho en condiciones de invernadero. Es por ello que la presente investigación tuvo como objetivo, desarrollar un método de cultivo de *C. bicrenata* en sustratos para la obtención masiva, de plántulas. Esporas de *C. bicrenata* fueron recolectadas de individuos silvestres, en un bosque mesófilo de montaña en la localidad de Tlanchinol, Hidalgo. Se inocularon 100 mg de esporas en siete sustratos: fibra de coco, peat moss, vermiculita, perlita, tezontle, fertilizante orgánico con bacterias aeróbicas y humus de lombriz. De acuerdo a sus propiedades físicas. Los resultados indican que el mejor sustrato fue el peat moss, en donde se presentó la germinación y formación del prótalo; en el suelo (testigo) y en perlita hubo germinación, pero no la formación de prótalos. En términos generales el tipo de sustrato y algunas propiedades físicas, como la retención de humedad, fueron los factores que determinaron la germinación, la formación de prótalos y la emergencia de esporofitos.

Palabras clave: *Cyathea bicrenata*, sustratos, pH, esporofito, prótalo, retención de humedad.

INTRODUCCIÓN

Los helechos comprenden alrededor de 10,000 especies en el mundo y están representados por 1,008 especies en México (Mickel y Smith 2004).

Los helechos arborescentes formaron densas selvas y bosques durante el periodo Carbonífero hace más o menos 300 a 250 millones de años (Gama, 2007). Son plantas que llegan a medir hasta 10 m de alto y tienen una gran importancia económica, ya que por su aspecto pueden ser cultivados como una especie ornamental, los rizomas al ser fibrosos, son comúnmente usados como “maquique”, un material utilizado para elaborar macetas que se usan como sustrato para orquídeas, bromelias, helechos y otras epifitas. Por ser una fibra natural que se mantiene húmeda por mucho tiempo, se ha incrementado la extracción indiscriminada de estas plantas (Palacios, 2006).

La familia Cyatheaceae comprende alrededor de 500 especies de helechos arborescentes (Márquez, 2010). *Cyathea bicrenata* es una especie, que se encuentra comúnmente en algunos bosques mesófilos de montaña de México. La situación actual que presenta esta especie es crítica debido a que se encuentra en zonas donde existen actividades antropogénicas, como la tala indiscriminada, los incendios de bosques, la extracción de especies.

El ciclo de vida de los helechos ha evolucionado durante millones de años. Una enorme cantidad de esporas caen al suelo (millones de ellas perecen) algunas otras encuentran la humedad y luz adecuada, dando origen a un minúsculo organismo unicelular que

comienza a crecer por división celular, hasta formar un pequeño gametofito o prótalo, cuya apariencia morfológica pasa por diferentes etapas: filamentos espatulados y en su mayoría son de forma de corazón (Fernández *et al.*, 2011). Debido a factores como la temperatura, el pH y la humedad relativa muchas de estas esporas no logran germinar, o si lo hacen, no se presente la fertilización y formación de prótalos, dado que esto va condicionado por la humedad relativa y la retención de agua en el suelo y los sustratos. Es por ello que en esta investigación, se buscó el sustrato adecuado para lograr una exitosa germinación, y para la propagación masiva de esta especie, bajo condiciones de invernadero

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de estudio se localiza a orilla de la carretera México-Tampico en la localidad de Tlanchinol, Hgo. (20° 55' 06" N y 98° 41' 55" O) a una altitud de 1476 msnm. La estación meteorológica más cercana fue la de Tlanchinol, Hgo., que se encuentra a 20° 59' 25" N y 98° 39' 25" O, a una altitud de 800 msnm. La temperatura media anual registrada es de 17.5 °C, con una precipitación anual de 2 276.2 mm año⁻¹. El clima es semicálido húmedo con lluvias todo el año. El área está catalogada como bosque húmedo de montaña (INEGI 2014).

Se realizaron tres visitas al sitio de estudio: 4 de diciembre de 2013, 22 de julio de 2015 y 28 de marzo de 2016, en las cuales se registró la temperatura y la humedad relativa del lugar en el mismo horario. Se obtuvo un promedio de estos resultados.

El trabajo se realizó en tres fases que fueron: la recolecta de material vegetal y suelo, siembra de esporas, elección de sustrato y análisis físicos de sustratos.

Primera fase

Recolecta de material vegetal

Se observaron los esporangios de las frondas de los individuos de *C. bicrenata* presentes en el área de estudio. Se hicieron observaciones detalladas en los soros con esporangios maduros, ya que suelen tener un aspecto granuloso con un color brillante; las frondas fueron elegidas por presentar esporangios apiñados. Las frondas se recolectaron, se colocaron en papel periódico por un periodo de 15 días. Las esporas se obtuvieron siguiendo la metodología de Bacchetta *et al.* (2008) y una vez que fueron liberadas se tamizaron en una malla de 62 μ , y se almacenaron en frascos de vidrio sellados, a una temperatura de 4 °C.

Recolecta de suelo

Las muestras de suelo se obtuvieron de un perfil, que se realizó en un sitio elegido por considerarse una zona sin perturbación, bajo el criterio de no presentar actividades como: ganadería, incendios, tala, ramoneo, cerca de donde se encuentra la especie de estudio. Se hizo recolecta de horizonte O y de cada capa de los horizontes sucesivos que iban desde 0-10, 10-15 y de 15 a más cm de profundidad (1 kg por horizonte). Las muestras recolectadas se secaron en un espacio cerrado.

Posteriormente se sometieron a análisis físicos y químicos: se midió la conductividad eléctrica (en agua relación 1:5), pH (en agua relación 1:2), contenido de materia orgánica (Walkey-Black, 1934), bases intercambiables (extraídas con acetato de amonio 1N pH 7.0 y analizadas por espectrofotometría de absorción atómica), concentración de

microelementos, textura (método de Boyoucos, 1962), densidad aparente (método del terrón y parafina), capacidad de campo y punto de marchitez.

Segunda fase

Siembra de esporas

Para la germinación de esporas se seleccionaron sustratos que se mencionan en el cuadro 1 de acuerdo a lo reportado por otros autores (Barros *et al.*, 2008). La fibra de coco se dispuso a remojar por 24 horas en agua desionizada, para lavar el contenido de sales. El pH de cada sustrato fue determinado con la técnica de Fernández *et al.* (2006). Los sustratos y el suelo que se tomó como testigo, se tamizaron en una malla con una apertura de 2 mm, excepto la perlita y la vermiculita que fueron tamizados en una malla de 4 mm. Se tomó una muestra de suelo de la capa superior de 0-10 cm. Se dejó secar y después se pasó por un tamiz de 2 mm. Los sustratos y el suelo se colocaron en costales de tela de manta y se esterilizaron en la autoclave, durante dos horas a una presión de 18 lbs; posteriormente fueron asperjados con una solución de benomil (1.5 g L^{-1}), se vaciaron en charolas de plástico y se esterilizaron en un horno de microondas por 30 min. Una vez esterilizados se pusieron a secar en charolas esterilizadas (aproximadamente una semana). Cuando los sustratos estuvieron secos, cada uno se depositó en charolas de plástico con capacidad de 500 ml, con domo transparente y perforaciones circulares (5 mm de diámetro) en la parte del domo y en la parte del soporte (previamente desinfectadas con alcohol al 96 %) que ayudaron a conservar la humedad relativa y evitar la contaminación del sustrato por partículas ajenas. La cantidad de sustrato depositado fue la suficiente para alcanzar el borde de la charola. Se utilizaron tres repeticiones por sustrato. Se pesó 100 mg de esporas (no desinfectadas) en trozos rectangulares de papel

aluminio en una balanza analítica. Con un pincel y a través de una malla de 92 μ se dispersaron las esporas en todas las charolas. El experimento se estableció el 24 de marzo del 2015. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. El riego se aplicó cada siete días con 60 ml de agua desionizada y pH ajustado a 4.5 (con HCl o NaOH al 1N). La temperatura y humedad relativa se evaluaron a las 7:30 am todos los días. Se determinó la presencia de germinación, cuando comenzaron a aparecer las primeras células protonemas. Para determinar el porcentaje de prótalos se hicieron observaciones desde la siembra hasta la formación de prótalos, estableciéndose el máximo, cuando ya no hubo aparición de nuevos prótalos de acuerdo a la metodología propuesta por Barros *et al.* (2008). Se hizo el conteo de prótalos, que no desarrollaron esporofitos y prótalos con esporofitos. Los datos se analizaron con un análisis de varianza, con una prueba de Tukey en el programa estadístico SAS versión Windows 9.0.

Cuadro 1. Tamaño de partícula de sustratos utilizados en la germinación, desarrollo de prótalos y esporofitos a partir de esporas de *C. bicrenata*.

Sustrato	Tamaño de partícula (mm)
Fibra de coco	2
Peat moss	2
Vermiculita	4
Perlita	4
Tezontle	2
Fertilizante orgánico con bacterias aeróbicas	2
Humus de lombriz	2
Suelo	2

Tercera fase

Elección de sustratos

A partir de la obtención de resultados de germinación, desarrollo de prótalos y emergencia de esporofitos, se eligieron los sustratos donde se presentó con éxito la germinación y formación de prótalos. Estos fueron: perlita, peat moss, y el suelo del sitio de colecta como testigo. Los sustratos se tamizaron de igual manera que en la segunda fase del experimento.

Análisis físicos de sustratos

Se evaluaron las propiedades químicas y físicas de los sustratos. Estos análisis se realizaron en septiembre del 2015 en el Laboratorio de Física de Suelos del Colegio de Postgraduados. Se determinó, la porosidad total (PT), porosidad de aireación (PA), porosidad de retención de humedad (PRH) y densidad aparente (DA). Las tres variables de porosidad se realizaron con el método de Landis *et al.*, (1990), el cual consistió en pasar el sustrato a máxima saturación, se obtuvo el peso del sustrato drenado y se secó el sustrato en una estufa para obtener el peso seco. La DA se evaluó con la fórmula $DA = \text{peso seco del sustrato (78 h a } 70 \text{ }^\circ\text{C)} \text{ (g)} / \text{volumen total del cono (cm}^3\text{)}$.

La curva de liberación de agua se determinó con el método de embudos de vidrio con una membrana de poros entre 10–50 micrones (De Boodt *et al.*, 1974). La curva integra los puntos de agua difícilmente disponible (ADD), agua fácilmente disponible (AFD), agua de reserva (AR), capacidad de aire (CA), espacio poroso total (EPT) y materia sólida (MS). Los sustratos fueron esterilizados de igual manera que en la segunda fase del experimento. Se estableció un experimento de densidad de siembra de 1 y 10 mg de

esporas previamente tamizadas en una malla de 62 μ , para eliminar resto de soros, esporangios o algún otro material vegetal. Posteriormente se cultivaron en la superficie de estos sustratos. Se hicieron cinco repeticiones por cada densidad (1 y 10 mg). Para la siembra se emplearon recipientes de plástico transparente, previamente esterilizados con alcohol al 96 % y con perforaciones en la base para drenar, con capacidad de 170 ml, esterilizados con alcohol al 96 %. Para conservar la humedad relativa de cada unidad experimental, se utilizaron domos de plástico transparentes. El diseño experimental empleado fue completamente al azar. Desde el primer día de su siembra, se regaron con 15 ml de agua desionizada con un pH ajustado a 4.5 (con HCl y NaOH a 1N), a los 30 días de su cultivo se les proporciono 15 ml de una solución nutritiva MS modificada al 100 % (macro y microelementos) modificada de Murashige y Skoog (1962) concentración al 100 % la modificación consistió en utilizar solo macro y micronutrientes, con un pH ajustado a 4.5 (con HCl y NaOH a 1N). El fertirriego fue cada 15 días intercalado con el agua desionizada, tal como es sugerido por Goudey (1985) y Barros *et al.* (2008).

El experimento se llevó a cabo dentro de un mini invernadero. Con cama de tezontle previamente esterilizado y con riego frecuente (dos veces por semana) con el propósito de conservar la humedad relativa. Se eligió un lugar donde la humedad relativa y la temperatura fueran semejantes a las que se registraron en su hábitat natural (humedad relativa arriba de 70 % y temperatura de 20 °C \pm 3). La humedad relativa y temperatura se registraron todos los días a la misma hora (9:00 pm). Se tomaron dos variables de respuesta: los prótalos desarrollados sin esporofito y los prótalos con esporofito. Con estos datos se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey, con el programa estadístico de SAS versión Windows 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de suelo

La textura del perfil superficial del horizonte A (0-10 cm) fue franco arcillosa, a franco limoso (Cuadro 2). Estos resultados coinciden con lo reportado por Cruz *et al.*, 2003 al realizar un estudio edáfico en un bosque mesófilo de montaña. Señalaron que en el bosque incipiente, donde los materiales presentaron un estado moderado de intemperismo, la textura fue franco limosa. Mientras que en el bosque joven y en el bosque maduro, donde los materiales estaban muy alterados, la textura fue franco arcillosa. Por otro lado, Luna *et al.*, (1994) describen el suelo de la zona de estudio y reportan suelos arcillosos, con una capa muy grande de materia orgánica, lo que da origen a un color oscuro.

Cuadro 2. Determinación de textura del suelo por el método de Boyoucos (1962).

Perfil (cm)	Arena	Limo (%)	Arcilla	Clasificación textural
0				
0-10	31	32	37	Franco arcillosa
10-15	38	41	21	Franco
15->	37	51	13	Franco limosa

Los valores de pH se presentan constantes en todo el perfil del suelo, moderadamente ácidos (cuadro 3). Los niveles altos de precipitación y una baja evapotranspiración, resultan en suelos saturados, adecuados para organismos anaerobios, que ocasionan suelos ácidos en el suelo de bosque mesófilo de montaña que van desde de 4 a 6 pH (González-Espinoza *et al.*, 2012).

La conductividad eléctrica se mantuvo constante en todo el perfil. Los valores reportados son más altos (Cuadro 3) en comparación con los que reportan Pavon *et al.* (2011) para el suelo de un bosque conservado (0.0036 mmhos/cm dSm) y menores de (0.0002 mmhos/cm dSm) para el suelo de un bosque con manejo, en la zona de Hidalgo (Cuadro 3).

El porcentaje de materia orgánica más alto, se registró en el horizonte O con un porcentaje de 27.1 % (Cuadro 3). En el suelo forestal, los suelos son húmedos con alto contenido de materia orgánica (Cruz *et al.*, 2003; González-Espinoza *et al.*, 2012).

Cuadro 3. Valores de pH, conductividad eléctrica y porcentaje de materia orgánica en el suelo de la zona de estudio.

Perfil (cm)	pH 1:2	C.E 1:5	M.O (%)
	H ₂ O	H ₂ O dSm	Walkey-Black
0	*	*	27.1
0-10	4.3	0.09	10.4
10-15	4.2	0.09	7.0
15 >	4.3	0.10	9.2

La concentración de cationes básicos intercambiables, en general, es muy baja por el ambiente que predomina en el área. La asimilabilidad de los elementos nutritivos es afectada de modo marcado por el pH. Con pH de 5 a 5.6 la mayoría de los nutrientes mantienen su máximo nivel de asimilabilidad; por debajo de pH 5, pueden presentarse deficiencias de N, K, Ca, Mg y B (Abad y Noguera, 1998) (Cuadro 4).

Para los contenidos de fósforo se hallaron trazas. Se conoce que en suelos forestales el contenido de este elemento es bajo. La importancia del pH se relaciona de manera directa con la disponibilidad de este elemento. En los suelos ácidos, la disponibilidad del fósforo

queda limitada por la presencia de aluminio y de hierro solubles. Así se concluye que para obtener buenos resultados en la nutrición fosfórica, son necesarias condiciones de pH del suelo entre 6 y 7 (Bidwell, 2002).

Cuadro 4. Determinación de bases intercambiables y micronutrientes en el suelo

Perfil	N	P Bray	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
(%)									
0	1.36	-	1.9	31.1	6.5	169	t	30	315
0-10	0.52	-	1.1	0.1	0.7	22	t	t	13
10-15	0.35	-	1.2	0.4	0.8	6	t	t	6
15 >	0.46	-	0.8	0.0	0.5	8	t	t	4

Capacidad de campo y punto de marchitez

La capacidad de campo del suelo en el horizonte A tuvo un porcentaje de 45 % de humedad gravimétrica (Figura 1). Se considera que es un contenido de humedad favorable para muchas especies que crecen en este ecosistema. El suelo de un bosque mesófilo de montaña se desarrolla en las laderas de las zonas montañosas y barrancas. Es un ecosistema que requiere una alta humedad atmosférica y abundantes lluvias (Vázquez *et al.*, 2006). Las zonas más protegidas guardan una mayor cantidad de humedad y en ellas son más frecuentes los helechos arborescentes (*Cyathea*) (Luna *et al.*, 1994). La retención de humedad es otra propiedad del suelo que está relacionada con la edad del bosque. Los horizontes orgánicos de los bosques más maduros retienen mayor contenido de humedad que los bosques más jóvenes, lo que está relacionado con el grado de descomposición del material orgánico previamente mencionado (Bautista, 2005).

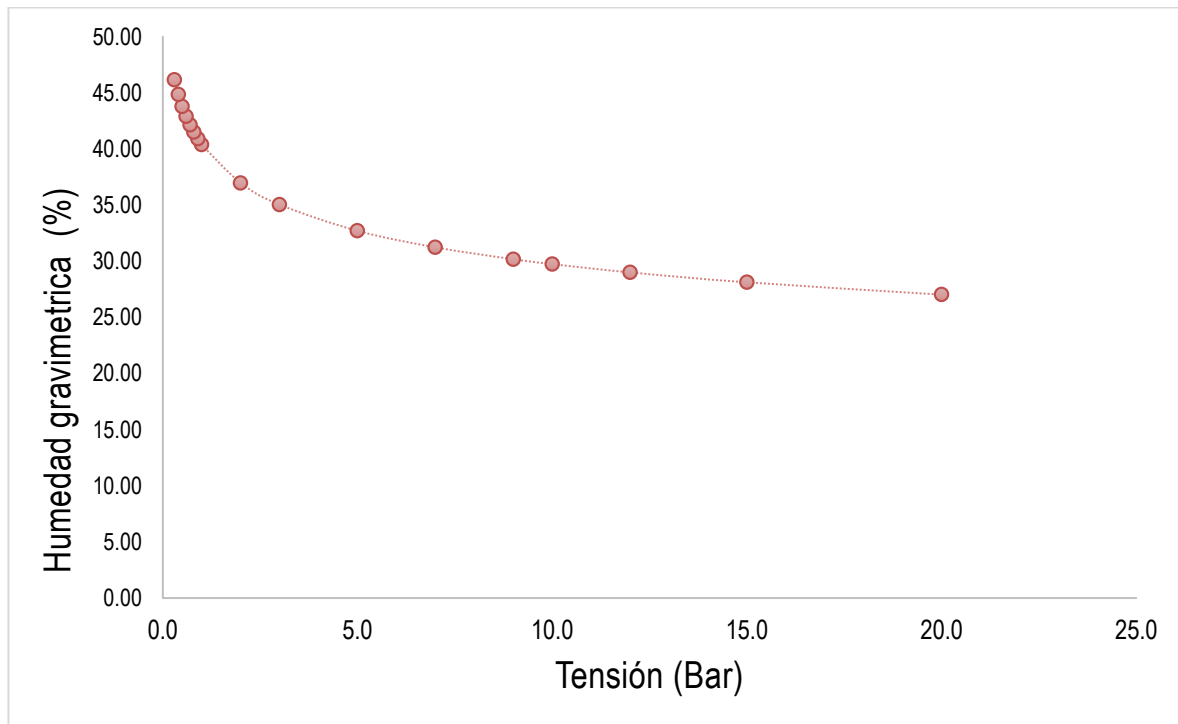


Figura 1. Curva de retención de humedad del suelo

Análisis de sustratos

El pH es una de las propiedades más importantes para asegurar una germinación exitosa. El sustrato donde se presentó el mayor número de esporofitos y gametofitos fue el peat moss con 87 y 643 seguido el testigo como suelo con 43 y 94 (Figura 2). Las esporas de la mayoría de los helechos, germinan en un intervalo de pH ligeramente ácido o neutro, aunque esto ocurre en especies altamente dependientes (Raghavan 1989). En combinación con otros factores ambientales, el pH puede afectar el desarrollo inicial y puede ser restrictivo para todo el ciclo de vida del helecho.

El establecimiento del esporofito está fuertemente limitado por la existencia de microhábitats adecuados para la generación gametofítica, los gametofitos puede ser muy sensibles a los cambios ambientales (Rechenmacher *et al.*, 2010). En sustratos orgánicos (como el peat moss), el rango óptimo de pH para el crecimiento de las plantas está comprendido entre 5 y 5.6. (Cuadro 5).

La turba es a menudo ácida, por lo que puede requerir la adición de cal para neutralizar (Goudey 1985). Ansorena (1994) comenta que las plantas pueden crecer sin restricciones en un amplio rango de pH (4 a 8), siempre que las concentraciones de nutrientes se mantengan en niveles suficientes.

Cuadro 5. Resultados de pH en diferentes sustratos y suelo

Sustrato	pH
Fibra de coco	6.19
Peat moss	3.94
Vermiculita	7.97
Perlita	7.23
Tezontle	7.43
Fertilizante orgánico con bacterias aeróbicas	9.35
Humus de lombriz	8.18
Suelo	4.52

El tamaño de la partícula para todos los sustratos incluyendo en el suelo fue de 2 mm a excepción de la vermiculita y perlita que fueron tamizadas a un tamaño de granulometría de 4 mm. El mayor porcentaje de germinación y formación de prótalos fue en peat moss, con un tamaño de 2 mm. Los resultados obtenidos de los análisis del tamaño de partícula, se aproximan a lo reportado por Abad y Noguera (1998). Ellos consideran que la fracción de 0.255 a 2.5.0 mm de diámetro, independientemente del sustrato de que se trate, es la que contiene la mejor combinación de aireación y agua de alta disponibilidad. Esta es la fracción que mejores características le imparte a los sustratos, pero además debe haber

una mezcla de fracciones más gruesas y más finas, que brinden un mejor balance de aire y agua al material. Lo anterior explica porque el tamaño de la partícula utilizada en la germinación de las esporas, mostró buena respuesta asociada con las partículas de 2 mm, que a su vez también estuvieron conjugadas con otras variables que promovieron la germinación.

En el cuadro 6 se presentan los valores de porosidad total, porosidad de aireación, porosidad de retención de humedad y densidad aparente.

La porosidad total del tratamiento con perlita mostró un porcentaje de 77.38 % mientras que en los tratamientos de peat moss y la mezcla de peat moss con perlita tuvieron los mejores resultados 84.73 y 86.50 % de porosidad (Cuadro 6). Landis *et al.* (1990) consideran adecuado una porosidad total de 60 a 80 %. Niveles de porosidad mayores a 80 % favorecen el crecimiento de la raíz. Un sustrato en general debe tener una porosidad total no menos del 70 % y es una de las propiedades más importantes. La porosidad de aireación (espacio ocupado por aire), es probablemente la propiedad física más importante de los sustratos en la horticultura ornamental.

Los valores de la porosidad de aireación fue mayor en la perlita con un 37.79 %, sin embargo la mezcla de perlita y peat moss tuvo una aireación de 37.79 % y es un valor que es considerado favorable, debido a un intervalo óptimo de porosidad de aireación en un sustrato debe variar entre 20 a 30 % (De Boodt y Verdonck, 1972) los valores por debajo de 10 % pueden causar problemas de anoxia en las raíces de las plantas (Burés, 1997). Sin embargo la porosidad de aireación más baja fue en el peat moss (Cuadro 6).

La porosidad de retención de humedad fue más alta en el sustrato de peat moss 69.45 %, esto explica de cierta manera como en este tratamiento se presentó una germinación exitosa. Se le atribuye que al contener más humedad, propicie la imbibición de las esporas y por ende su exitosa germinación, y esto a su vez propicia la fertilización de las esporas dando como resultado el esporofito (Cuadro 6). El sistema radicular de un helecho debe tener acceso al oxígeno y agua. Mientras que algunos helechos tolerarán saturación (por ejemplo, *Osmunda* spp.). A la mayoría no les gustan las raíces constantemente húmedas. Los esporofitos jóvenes tienen sistemas de raíces pequeñas, que necesitan una fuente constante de humedad para asegurar que se cumplan sus necesidades de agua. Como resultado, a menudo son encapsulados en las mezclas que contienen altas cantidades de musgo de turba (Hoshisaki y Moran, 2001). A los cultivadores les resulta preferible aplicar agua a la superficie del suelo y no del follaje, como follaje húmedo es susceptible a la enfermedad. Además, los niveles de humedad deben ser variados como la humedad constante puede causar raíces se pudran, especialmente durante los meses más fríos (Goudey, 1985, Hoshisaki y Moran, 2001). Se colocan en una zona húmeda junto a la zona de nebulización durante 2 a 3 días para estabilizar, justo antes de su trasplante.

En cuanto a la densidad aparente, Abad y Noguera (1998) mencionan que esta propiedad física es importante durante el manejo y manipulación de los sustratos y contenedores, en donde se debe tomar en cuenta su peso. Además el anclaje de las plantas también es un factor importante. Ellos indican que los valores óptimos de densidad aparente se encuentran entre 0.3 a 0.8 g cm⁻³. Sin embargo otros autores Raviv *et al.* (2004) indican que un valor adecuado de densidad aparente se encuentra a valores más bajos de 0.40 g.cm⁻³, estos resultados coinciden con los reportados en el (Cuadro 6).

Cuadro 6. Propiedades físicas de los sustratos

Sustrato	Porosidad Total (%)	Porosidad de aireación (%)	Porosidad de retención de humedad (%)	Densidad aparente (g mL ⁻¹)
Peat moss	84.73	15.27	69.45	0.09
Perlita	77.38	37.79	39.59	0.12
Peat moss+ Perlita (1:1)	86.50	23.97	62.54	0.12

El mejor porcentaje de prótalos con esporofitos y sin esporofitos se obtuvo con el tratamiento de peat moss, tuvo diferencia significativa con el tratamiento de la perlita y el suelo como testigo (Cuadro 7). La retención de humedad es un factor importante para la germinación y el establecimiento de los prótalos, el peat moss fue el tratamiento con mayor porcentaje de humedad volumétrica (Figura 3). Mientras que en el tratamiento de perlita, solo se presentó germinación, pero no formación de prótalos, tampoco emergencia de esporofitos. Estos resultados son similares a los que reporta Barros *et al.* (2008) quienes germinaron esporas del género *Cyathea* en una mezcla de peat moss y perlita alcanzaron el mayor número de gametofitos y esporofitos. Para el caso contrario donde se experimentó con perlita, no hubo formación de prótalos, esto se atribuye a que la perlita sola se considera un sustrato ineficiente, que está relacionado con la baja retención de agua de este material en comparación con los otros tratamientos (Figura 2).

Los esporofitos obtenidos se traspasaron a una mezcla de sustratos de peat moss+ perlita (1:1) y permanecieron en las mismas condiciones de invernadero, con un fertirriego de 15 ml solución de Murashige and Skoog (1962) modificada por los autores (macro y micronutrientes) cada 15 días (Figura 3), y un riego con agua desionizada cada semana alternando con el fertirriego.

Cuadro 7. Numero de prótalos con esporofito y prótalos sin esporofito de *C. bicrenata*

Sustrato	Prótalos con esporofito		Prótalos sin esporofito	
Peat moss	87	a	643	a
Perlita	0	b	0	b
Suelo	43	ab	94	b

Los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada tratamiento, son distintos según Tukey (P = 0.05) n = 3



Figura 2. Sustratos donde se presentó germinación, formación de prótalos y presencia de esporofitos de *C. bicrenata*. Derecha peat moss, centro testigo e izquierda perlita



Figura 3. Plántula de *C. bicrenata* obtenida del sustrato de peat moss, a los 476 días.

La germinación en el experimento de densidad de siembra no presentó diferencia significativa en ninguna de las dos densidades de siembra (1 y 10 mg). (Cuadros 8 y 9). La densidad de población es uno de los factores que afectan a la expresión sexual y crecimiento de las comunidades de los gametofitos en poblaciones hacinadas, los recursos están limitados por la competencia, y los gametofitos son a menudo asexuales o masculinos y angostos (generalmente de forma espatulada). Por otra parte los gametofitos femeninos, a menudo se producen en poblaciones dispersas. Cuando gametofitos son escasos, cada gametofito puede obtener más recursos que los que gametofitos en poblaciones densas (Yao-Moan *et al.*, 2004).

Cuadro 8. Numero de prótalos con esporofito y sin esporofito de 1mg de esporas de *C. bicrenata* en diferentes sustratos.

Sustrato	Prótalos con esporofito	Prótalos sin esporofito
Peat moss	0.8 a	1 a
Perlita+ peat moss (1:1)	2 a	2.8 a
Suelo (Testigo)	0.4 a	1.2 a

Los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada tratamiento, son distintos según Tukey (P = 0.05) n = 5

Cuadro 9. Numero de prótalos con esporofito y sin esporofito de 10 mg de esporas de *C. bicrenata* en diferentes sustratos.

Sustrato	Prótalos con esporofito	Prótalos sin esporofito
Peat moss	0.6 a	1.8 a
Perlita+ peat moss (1:1)	2.2 a	5.8 a
Suelo (Testigo)	5 a	2.8 a

Los valores con letras diferentes dentro de cada columna para cada tratamiento, son distintos según Tukey (P = 0.05) n = 5

Las curvas de retención de agua nos indicaron que el mayor porcentaje de retención de agua lo obtuvo el sustrato peat moss con 45.26 % (Figura 3) seguido de la mezcla de peat moss con perlita (1:1) con un porcentaje de 36.73 % (Figura 4) y por último la perlita fue la que obtuvo el menor porcentaje de retención de agua con un valor de 34.79 % (Figura 5). Estos resultados coinciden con los reportados por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2011) en los que afirman que los sustratos que retienen menor cantidad de agua son los materiales inorgánicos puros y hacen énfasis en los materiales y mezclas con diámetros de 2-3 mm que retienen una cantidad ligeramente mayor.

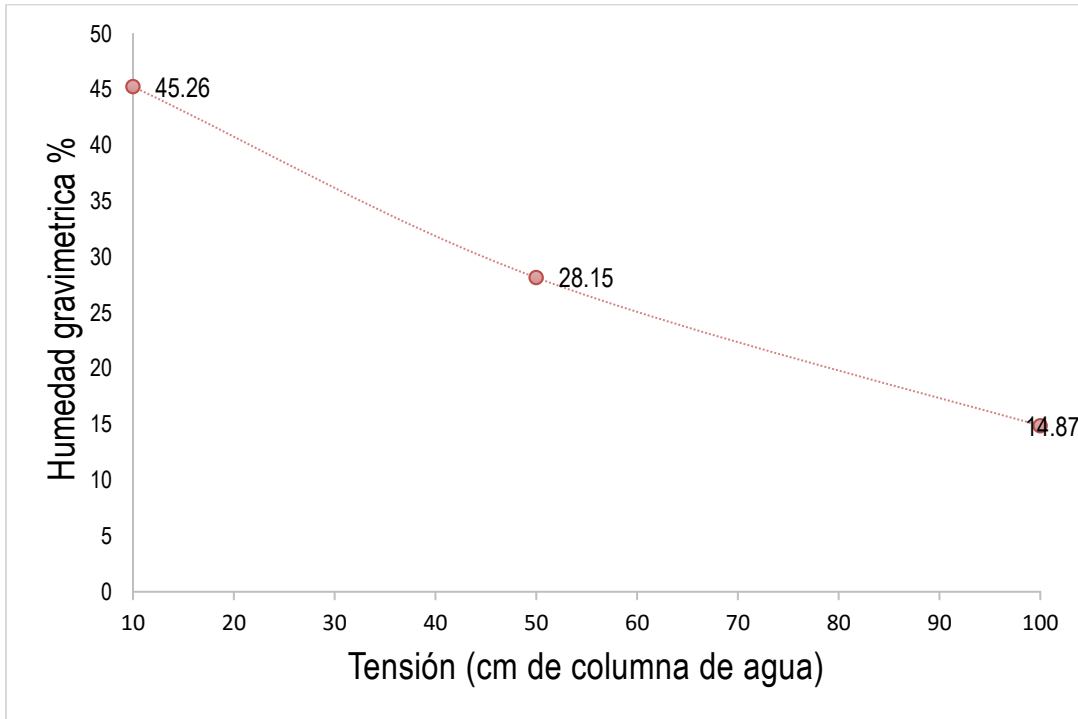


Figura 4. Curva de retención de agua en sustrato peat moss

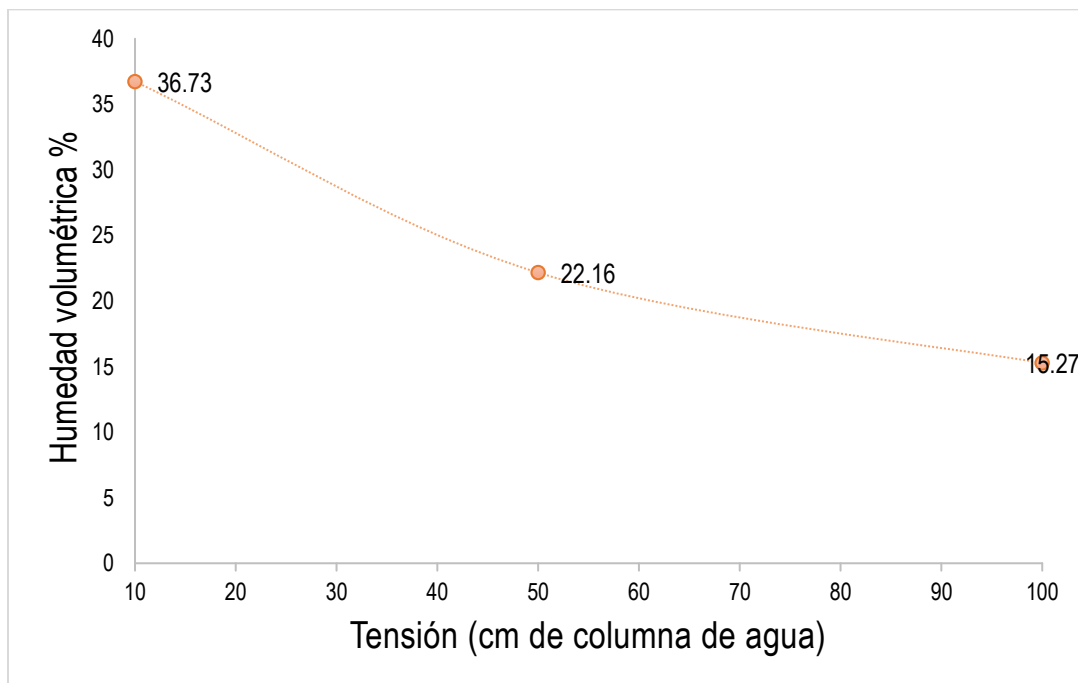


Figura 5. Curva de retención de agua en sustrato peat moss+ perlita (1:1)

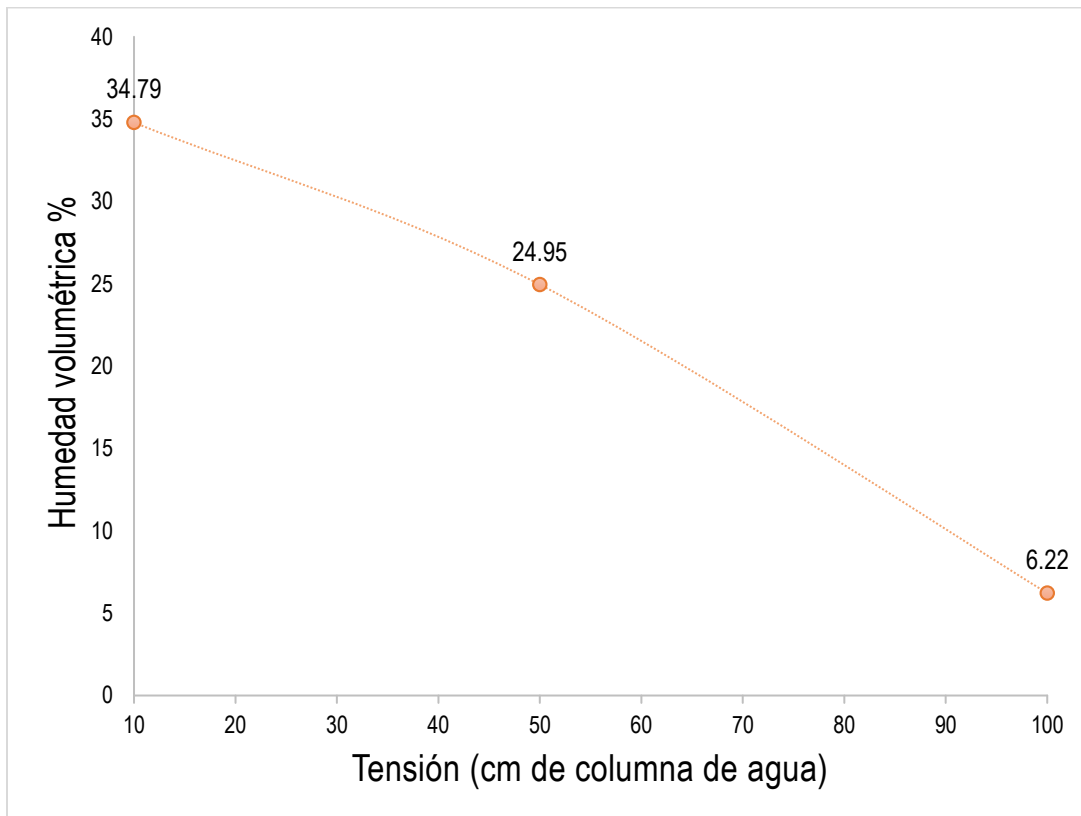


Figura 6. Curva de retención de agua en sustrato perlita.

CONCLUSIONES

El peat moss es un sustrato que cumple con las características adecuadas para que la germinación de esta especie, la retención de humedad y el tamaño de la partícula son características idóneas que favorecen la germinación de esta especie.

El mayor número de prótalos con esporofitos y sin esporofitos, se obtuvo con el sustrato de peat moss.

En el experimento de densidad de siembra, no hubo diferencia significativa en ambas densidades 1 y 10 mg de esporas de *C. bicrenata*.

LITERATURA CITADA

- Abad, M., Y P. Noguera. 1998.** Sustratos para el cultivo sin suelo y fertirrigación. En: Cadahía, C. (coord). Fertirrigación. Cultivos Hortícolas y Ornamentales. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 287-342.
- Ansorena, J. 1994.** Sustratos. Propiedades y caracterización. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 169 p.
- Bacchetta, G., Ballesteros, D., Belletti, P., Brullo, S., Bueno, A., Cagelli, L., Cano, M., Carasso, V., Carrió, E., Casas, J., Caujapé, J., Cervelli, C., Draper, D., Escribá, M., Fenu, G., Gómez-Campo, C., Gorian, F., Grillo, O., Güemes, J., Jiménez-Alfaro, B., Marques, I., Mattana, E., Mulè, P., Nepi, M., Pacini, E., Pavone, P., Piotto, B., Pontecorvo, C., Prada, A., Serrano, F., Venora, G., Vietto, L y Virevaire, M. 2008.** Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias. La Caixa. 378 pp.
- Barros, A., Salinero, C. Vela, P. y M. J. Sainz. 2008.** Método rápido para la propagación de helechos ornamentales. Actas de Horticultura 52.
- Bautista, A., Gutiérrez, C., Castillo, S. y Etchevers, B. 2005.** Cronosecuencia de un suelo y su clasificación en un área originalmente ocupada por bosque mesófilo de montaña. Terra Latinoamericana. 23(2):147-157.
- Bidwell, R.G.S. 2002.** Fisiología vegetal. (3a Reimpresión). AGT Editor, S.A. México.
- Bouyoucos, G.1962.** Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agron. J., 54: 464-465.

- Burés, S. 1997.** Sustratos. Ediciones Agrotécnicas. Madrid, España. 342 p.
- Cruz, A., Castillo, R. y Gutiérrez, C. 2003.** Patrones de desarrollo del suelo asociados con sucesión secundaria en un área originalmente ocupada por bosque mesófilo de montaña. *Ecosistemas*: 3.
- De Boodt, M., y O. Verdonck. 1972.** The physical properties of the substrates in horticulture. *Acta Hort.* 26: 37-44.
- De boodt, M., O. Verdonck, y I. Cappaert. 1974.** Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Hort.* 37: 2054-2062.
- Fernández, L., Rojas, A., Roldán, C., Ramírez, I., Zegarra, M., Uribe, R., Reyes, A., Flores, H. y Arce, O. 2006.** Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 180 pp.
- Fernández, H. Kumar, A y Revilla, M. 2011.** Working with ferns. Issues and applications. Springer. New York Dordrecht Heidelberg London.386pp.
- Gama, F. M. A. 2007.** Biología I. Un enfoque constructivista. Tercera edición. Pearson Educación México. 352 pp.
- González-Espinosa, M., Meave, J., Ramírez-Marcial, N., Toledo-Aceves, T., Lorea-Hernández, F. y Ibarra-Manríquez, G. 2012.** Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Ecosistemas* 21 (1-2): 36-52.

Goudey, C.J. 1985. Maidenhair ferns in cultivation, Lothian Publishing Company Pty. Ltd., Melbourne, Australia.

Gutiérrez-Castorena, M. C; Hernández-Escobar, J., Ortiz-Solorio, C.A., Anicua-Sánchez, R. y Hernández-Lara, M.E. 2011. Relación porosidad-retención de humedad en mezclas de sustratos y su efecto sobre variables respuesta en plántulas de lechuga. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(3): 183-196.

Hoshizaki, B. J. y Moran, R. C. 2001. Fern growers manual, Timber Press, Portland, Oregon USA.

INEGI. 2014. Anuario estadístico y geográfico de Hidalgo 2014. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México: INEGI. 611 pp.

Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. Mc Donald, Y J. P. Barnett. 1990. The Container Tree Nursery Manual. Containers and Growing Media. Vol. 2. Agric. Handbook. 674. Washington: USDA, Forest Service. 88 p.

Luna, V., Ocegueda, S. y Alcantara, A.1994. Florística y notas biogeográficas del bosque mesofilo de montaña del municipio de Tlanchinol Hidalgo, México. Anales del Instituto de Biología. UNAM. México. Ser. Bot. 65(1):31-62.

Márquez, J. 2010. La familia Cyatheaceae (Pteridophyta) en Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 45: 1-2.

Mickel, J. T. y Smith A. R. 2004. The pteridophytes of Mexico. New York: New York Botanical Garden Press. 1054 pp.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SEMARNAT. 2010. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.

Palacios Rios, M. 2006. *El maquique.* [online] Pteridophyta. Available at: [http://www.helechos.com.mx/3Proyectos/2EI_Maquique/2aEI_Maquique\(espagnol\)/2aEI_Maquique_\(espagnol\).html](http://www.helechos.com.mx/3Proyectos/2EI_Maquique/2aEI_Maquique(espagnol)/2aEI_Maquique_(espagnol).html) [Accessed 22 Mar. 2015].

Pavón., Moreno, C y Ramírez, A. 2011. Biomasa de raíces en un bosque templado con y sin manejo forestal en Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.* 303-312.

Raghavan, V. 1989. *Developmental biology of fern gameophytes,* Cambridge University Press, New York.

Raviv, M., R. Wallach, y T. Blom. 2004. The effect of physical properties of soilless media on plant performance, a review. *Acta Hort.* 644: 251-259.

Rechenmacher, C., Schmitt, J.L. and 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):1155-1160.

Vázquez, T., Campos, J. y Cruz, P. 2006. Los helechos y plantas afines del bosque mesófilo de montaña de banderilla, Veracruz, México. *Polibotánica.* 22:63-77.

Walkley, A. y I. A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-37.

Yao-Moan, H., Hsueh-Mei, C.y Wen-Liang, C. 2004. Density affects gametophyte growth and sexual expression of *Osmunda cinnamomea* (Osmundaceae: Pteridophyta). *Annals of Botany* 94: 229–232.