

# Propagación de dos helechos arborescentes (Cyatheaceae) del bosque nuboso guatemalteco por medio de tres metodologías diferentes

*Propagation of two tree ferns (Cyatheaceae) from the Guatemalan cloud forest by three different techniques*

Andrea M. Cabarrús  \*

\*Escuela de Biología, Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala

\*Autor al que se dirige la correspondencia: [andrea.cabarrus@gmail.com](mailto:andrea.cabarrus@gmail.com)

Recibido: 17 de septiembre 2024 / Revisión: 13 de noviembre 2024 / Aceptado: 20 de diciembre 2024

## Resumen

Los helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae están en especial peligro. Son organismos de crecimiento lento, y su extracción de los bosques originarios para el uso como sustituto de sustrato para bromelias y orquídeas ha colocado en riesgo las poblaciones locales. Al ser organismos que tienen requerimientos especiales para su crecimiento y desarrollo, un acercamiento a su propagación podría ser la base para ejecutar futuros proyectos de conservación de las especies. Se contrastaron durante cuarenta semanas tres tratamientos diferentes de propagación de esporas para las especies *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* (Maxon) R.M. Tryon y *Sphaeropteris horrida* (Liebm.) R.M. Tryon; también se evaluaron tres especies de interés comercial y de fácil propagación como referencia. Se usó un método de propagación convencional con un sustrato de musgo de turba preparado como control, un tratamiento in vitro utilizando el medio de cultivo Murashige & Skoog completo (M&S 100) y a media concentración de nutrientes (M&S 50) y un medio alternativo de propagación por un sustrato artificial de tela de algodón. El objetivo era encontrar un medio favorable económico, cuyo índice de germinación y establecimiento fuera adecuado para futuros programas de propagación de estas especies. Se encontró que en la técnica in vitro se obtuvo una germinación del 93.15% para *S. horrida*, sin embargo *C. divergens* obtuvo 5.2% únicamente. Se generaron un total de 1224 plántulas jóvenes de *S. horrida*, y ninguna de *C. divergens*. En cuanto a los costos de producción, el costo promedio por esporofito obtenido fue de Q1.10 para el cultivo en sustrato y de Q95.96 para los obtenidos en el cultivo en laboratorio.

Palabras clave: *Cyathea*, *Sphaeropteris*, conservación, propagación, cultivo

## Abstract

The tree ferns of the Cyatheaceae family are in danger. They are slow-growing organisms, and their extraction from native forests for use as a substrate substitute for bromeliads and orchids has placed local populations at risk. As organisms with specific requirements for growth and development, an approach to their propagation could serve as the foundation for future conservation projects for these species. Over a period of forty weeks, three different spore propagation methods were compared for the species *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* (Maxon) R.M. Tryon and *Sphaeropteris horrida* (Liebm.) R.M. Tryon; three commercially valuable and easily propagated species were also evaluated as references. A conventional propagation method using prepared peat moss substrate was used as a control, an in vitro treatment using full-strength Murashige & Skoog culture medium (M&S 100) and half-strength nutrient concentration (M&S 50), and an alternative propagation method using an artificial cotton cloth substrate. The goal was to find a cost-effective medium with a germination and establishment rate suitable for future propagation programs of these species. It was found that the in vitro technique achieved a germination rate of 93.15% for *S. horrida*, while *C. divergens* achieved only 5.2%. A total of 1,224 young sporophytes of *S. horrida* were produced, and none of *C. divergens*. In terms of production costs, the average cost per sporophyte obtained was Q1.10 for substrate cultivation and Q95.96 for laboratory cultivation.

Keywords: *Cyathea*, *Sphaeropteris*, conservation, propagation, cultivation



(C) Autor(es). *Ciencia, Tecnología y Salud*, es editada por la Universidad de San Carlos de Guatemala, bajo licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/legalcode>). El contenido de esta publicación es responsabilidad de su(s) autor(es).

## Introducción

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

Los helechos forman parte imprescindible de los ecosistemas, y son esenciales para los ciclos del agua, el nitrógeno, el carbono, entre otros (Jiménez Barrios, 2009; Mehltreter et al., 2010; Stadtmüller, 1986). Los helechos arborescentes están en especial peligro, ya que son organismos de crecimiento lento, y su extracción de los bosques originarios del país ha colocado en riesgo las poblaciones locales (Muñiz Díaz de León et al., 2007; Salinas et al., 2008; Véliz Pérez & Vargas Ponce, 2006). La cosecha masiva de las masas de raíces surte a la demanda de los viveros y extractores de epífitas, sobre todo de orquídeas y bromelias (Véliz Pérez & Vargas Ponce, 2006).

El ciclo de vida comienza con una espora. La espora germina y da origen a la estructura conocida como gametofito (n) (Campbell & Reece, 2007; Hoshizaki & Moran, 2001; Mehltreter et al., 2010). La germinación de las esporas se activa, en la mayoría de los casos, por una combinación de la exposición a la humedad, exposición a la luz y a veces se ve influenciada por exposición a hormonas de otros gametofitos ya desarrollados, que pueden inhibir o favorecer el desarrollo de más individuos (Mehltreter et al., 2010; Riaño Ospina et al., 2015). Una vez se desarrollan los gametofitos, maduran e inician la producción de gametos. El gameto masculino es una célula móvil, la cual necesita una película de agua para poder alcanzar a la ovocélula, que permanece inserta en el gametofito femenino. Una vez ocurre la fecundación se forma el

cigoto (2n), seguido por un embrión que posteriormente será un esporofito (Campbell & Reece, 2007; Ranker & Haufler, 2008; Schneider, 2012). Una vez formado el esporofito, se tiene una fase juvenil e inmadura, durante la cual el helecho crece y se desarrolla, pero sin formar ninguna estructura productora de esporas, en esta fase los frondes que suelen desarrollarse presentan diferencias morfológicas con los frondes adultos (Barros et al., 2008; Hoshizaki & Moran, 2001; Mehltreter et al., 2010). Una vez alcanzada la madurez del organismo y ya establecida la formación de frondes adultos, se comienzan a tener esporangios, agrupados en soros, y estos se agrupan en patrones diferenciados (Campbell & Reece, 2007; Hoshizaki & Moran, 2001). Dentro de los esporangios ocurre la esporogénesis, la vía productora de esporas, para que luego de madurar sean liberadas y así de inicio el ciclo de un nuevo organismo (Ranker & Haufler, 2008).

La conservación ex situ de los helechos ha sido practicada utilizando varias técnicas: reproducción por esporas, reproducción vegetativa y reproducción in vitro (Barros et al., 2008; Jiménez Barrios, 2012; López-Romero et al., 2016; Ruiz Robleto, 1995). Una desventaja del método de laboratorio es que los organismos que están adaptados a las condiciones ideales del cultivo in vitro, deben pasar por una fase posterior de aclimatación en invernadero, es esta fase en la cual se pueden perder la mayoría de individuos si no se genera un protocolo correcto (Barros et al., 2008; Jiménez Barrios, 2012; López-Romero et al., 2016; Ruiz Robleto, 1995).

La siembra convencional de esporas consiste en su dispersión en un medio controlado. El sustrato más utilizado para este método es musgo de turba con perlita y vermiculita en diferentes proporciones, a un pH entre 5.5 y 6.5 (Barros et al., 2008; Bernabe et al., 1999). El otro método de propagación por esporas es por cultivo in vitro por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales (CT). El CT maneja condiciones estrictas de laboratorio (Fernández et al., 2013; Seguí Simarro, 2010). El sembrador utiliza un medio de cultivo nutritivo a su elección donde se colocan los cultivos deseados en contenedores ya estériles y, en condiciones de laboratorio, se almacenan hasta la germinación, formación de las plántulas y posterior establecimiento (Rechenmacher et al., 2010; Sharry et al., 2015). Aunque es un método exitoso de propagación para casi cualquier tipo de organismo vegetal, el costo de producción es alto (Barros et al., 2008; Martín Gordo et al., 2012). Otro método propuesto en esta investiga-

ción fue una modificación del método utilizado por el botánico alemán Uwe Martin Herbert Feldhoff Böhm para la propagación de bromelias y orquídeas que su empresa, Claveles del Aire, S.A., exporta. La técnica consiste en sustituir el sustrato común por un medio sintético, como sería un lienzo de tela o de algodón. Lo anterior se basa en un principio básico para la germinación de semillas y esporas, el cual establece que para la germinación únicamente se necesita humedad, esto es para romper la latencia inicial, denominada fase I (Ázcón-Bieto & Talón, 2013.; Escaso Santos et al., 2010). Este método podría economizar recursos, haciendo aún más viable la propagación de los helechos a bajo costo, en comparación con los otros métodos.

Se contrastaron los tres métodos de propagación: convencional, in vitro y la modificación del método Feldhoff para validar una metodología para la propagación y establecimiento de helechos arborescentes que sea económicamente viable en base a la relación costo-beneficio de cada método.

## Materiales y Métodos

### Muestras

Los frondes y las esporas fueron colectados en dos sitios representativos del bosque nuboso guatemalteco y en temporalidades distintas. Para elegir a los individuos se usaron los criterios de: helecho maduro, con esporas presentes, y más de tres frondes para no afectar el crecimiento del helecho ni colocar en riesgo su subsistencia. El primer grupo fue colectado en el Biotopo para la Conservación del Quetzal “Mario Dary Rivera” en diciembre de 2018. Se eligieron tres individuos de la especie *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* al azar en los senderos del parque y se colectó del único individuo de la especie *Sphaeropteris horrida* que está ubicado en la entrada del parque. La segunda colecta se realizó en el mes de julio de 2019 en la Reserva Natural Privada ORQUIGONIA. Se eligieron tres individuos de ambas especies al azar, fuera de los senderos a los que el público tiene acceso.

Se colectaron además esporas de tres especies de helechos ornamentales y/o de fácil cuidado con el fin de validar los tratamientos utilizados para los helechos arborescentes. Estos helechos fueron colectados: *Adiantum* sp. en los lugares de colecta de los helechos arborescentes. *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott en el Jardín Botánico CECON-USAC y *Asplenium antiquum*

Makino en dos jardines urbanos de la ciudad de Guatemala. El manejo, secado y extracción de esporas fue estandarizado siguiendo las sugerencias y lineamientos de varios autores (Farfán-Santillán et al., 2017; Gabriel y Galán et al., 2008; Juárez-Orozco et al., 2013; López-Romero et al., 2016; Riaño Ospina et al., 2015).

### Desinfección de las esporas

La esterilización de las esporas antes de la siembra también fue estandarizada tomando como base la desinfección de Pence (2015). Se colocaron las esporas previamente pesadas (0.12g para cada serie/repetición por especie) en un papel filtro de cafetera comercial y se aseguró el extremo superior con un hule de papelería de oficina. Esta bolsita de esporas de colocó por 15 min en 100 ml etanol 70%, luego se sumergieron en 80 ml de hipoclorito de sodio 4% v/v con 2 gotas del agente dispersante de superficie Tween 20® y finalmente se dieron 3 lavados de 10 min cada uno en agua estéril. Luego de la esterilización se procedió a la siembra.

### Siembra

#### *Tratamiento 1: siembra convencional*

Para la siembra convencional se usaron cajas de acrílico de capacidad de 12 L cada una, 5 repeticiones por especie con 0.12 g de esporas cada una. El sustrato utilizado fue de musgo de turba preparado con perlita y vermiculita y un pH de 6. Se dividió cada unidad experimental en seis secciones igual y las esporas fueron sembradas por aspersión, colocando los 0.12 g de esporas ya desinfectadas en 100 ml de agua desmineralizada estéril, mezclando con un agitador de vidrio y tomando alícuotas de 5 ml con una jeringa comercial sin aguja y liberando su contenido en los cuadrantes de la unidad experimental. Se añadieron 16ml de la suspensión de esporas y agua por cuadrante. Luego de la siembra se identificaron las unidades experimentales, se les colocó tapa y se apilaron en el lugar correspondiente.

#### *Tratamiento 2: siembra in vitro*

Se utilizó el medio de cultivo Murashige & Skoog (M&S). Se colocaron 50 ml de medio de cultivo en frascos de vidrio de 9 oz de capacidad. Se esterilizó todo el material a utilizar y el medio de cultivo en au-

toclave por 25 min a 125 °C y 20 psi. La desinfección de las esporas se hizo dentro de la campana de flujo laminar lista para la siembra, con equipo y cristalería también ya estéril. Para la siembra se procedió a abrir el papel filtro en su totalidad y extenderlo en la superficie, se dividió en 10 partes iguales, cada una de ellas correspondiente a una unidad experimental. Se colocó dentro el frasco el papel filtro con las esporas boca abajo, en contacto directo con el medio de cultivo, con las pinzas se retiró el papel y se añadieron 4 gotas de agua desmineralizada estéril, se agitó con cuidado para que las esporas se dispersaran en todo el medio de cultivo, se procedió a tapar cada frasco y a su identificación. Fueron depositados en el cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 h y una temperatura promedio entre los 21 y los 26 °C.

### Tratamiento 3: nueva metodología propuesta

Se usaron cajas de acrílico de capacidad de 12 L cada una, 5 repeticiones por especie con 0.12 g de esporas cada una. Se colocaron 3 capas de algodón quirúrgico en el fondo, seguidas de 2 capas de tela de algodón de nombre comercial Ojo de Perdiz. La siembra se realizó por medio de aspersión igual que en el tratamiento 1. Luego de la siembra se identificaron las unidades experimentales, se les colocó tapa y se apilaron en el lugar correspondiente.

### Análisis estadísticos y procesamiento de datos

Para poder tener puntos de comparación entre los métodos a ejecutar se tomaron los estándares propuestos por Barros et al., (2008), Bernabeet al., (1999) y Rünk y Zobel (2009): el aparecimiento de puntos verdes indicaba el inicio de la germinación (fase 1) esta fase debe presentarse en las primeras siete semanas a veinte semanas; el inicio de la formación de gametofitos inmaduros (fase 2) durante las siguientes cinco a siete semanas, la estructura es una lámina verde, uniestratificada sin forma o levemente cordiforme; el surgimiento de gametofitos maduros (fase 3) durante las siguientes diez semanas, se identifica principalmente por su forma cordiforme y tamaño; y el surgimiento de esporofitos jóvenes (fase 4), esta etapa inicia con la primera observación de un fronde joven que surge del gametofito femenino luego de la fecundación. Los esporofitos son de desarrollo lento, para esta fase se establecieron las semanas restantes del estudio, ya que los esporofitos jóvenes son propensos a enfermar o a

no establecerse de manera correcta si las condiciones no son las adecuadas. El tiempo de análisis y toma de datos fue de cuarenta semanas luego de la siembra. Se realizó el análisis de los rendimientos de germinación utilizando el índice de cobertura de Braun-Blanquet (Narváez-Parra et al., 2013; Ramírez et al., 2000; Reyes et al., 2019; Turner et al., 2001).

Se dividieron las unidades experimentales en partes iguales por medio de una grilla digital, correspondientes a 1% de germinación en los tratamientos 1 y 3, y al 1.15% de germinación en el tratamiento 2. El acumulado de la germinación se registró semanalmente durante 40 semanas, tomando fotografías profesionales y analizándolas con Adobe® LightRoom® CC ver. 15.8 y Adobe® Photoshop® CC ver 15.6 con el fin de resaltar los tonos verdes, verde-azulados y verde-amarillos y así distinguir los gametofitos de las partículas de sustrato, las imperfecciones de la tela y resaltarlos en el medio de cultivo in vitro.

La eficacia de los métodos se evalúo según los siguientes criterios: tiempo de germinación en días; tiempo de formación del primer esporofito en días; tiempo de establecimiento, en días o hasta el final del tiempo establecido de análisis y toma de datos; número total de organismos establecidos; relación costo/beneficio en quetzales y costo por plántula generada por cada uno de los métodos.

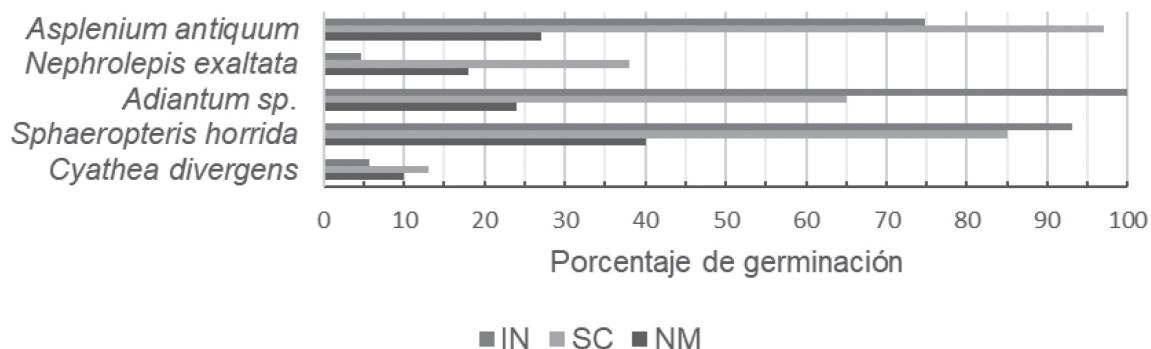
## Resultados

La germinación se dio en todos los métodos para las cinco especies evaluadas. En la Figura 1 se observan los porcentajes de germinación alcanzados por tratamiento. El método in vitro fue el más exitoso alcanzando hasta el 100% de germinación en las unidades de siembra para *Adiantum* sp. Seguido del 93.15% para *S. horrida* y 74.75% para *A. antiquum* en periodos cortos de tiempo. Estas tres especies también obtuvieron mejor germinación en los otros dos tratamientos. Para *C. divergens* y *N. exaltata* los rendimientos fueron los más bajos, siendo *C. divergens* la especie con menores porcentajes de germinación en todos los métodos evaluados. El cultivo in vitro obtuvo los mejores porcentajes de germinación para todas las especies. Mientras que el tratamiento con menores porcentajes de germinación para todas las especies fue el del sustrato sintético.

Se procesaron un total de 10,955 fotografías para evaluar las fenologías. En los tres tratamientos evaluados todas las especies germinaron y

**Figura 1**

Porcentajes de germinación alcanzados por tratamiento en las diferentes especies del estudio



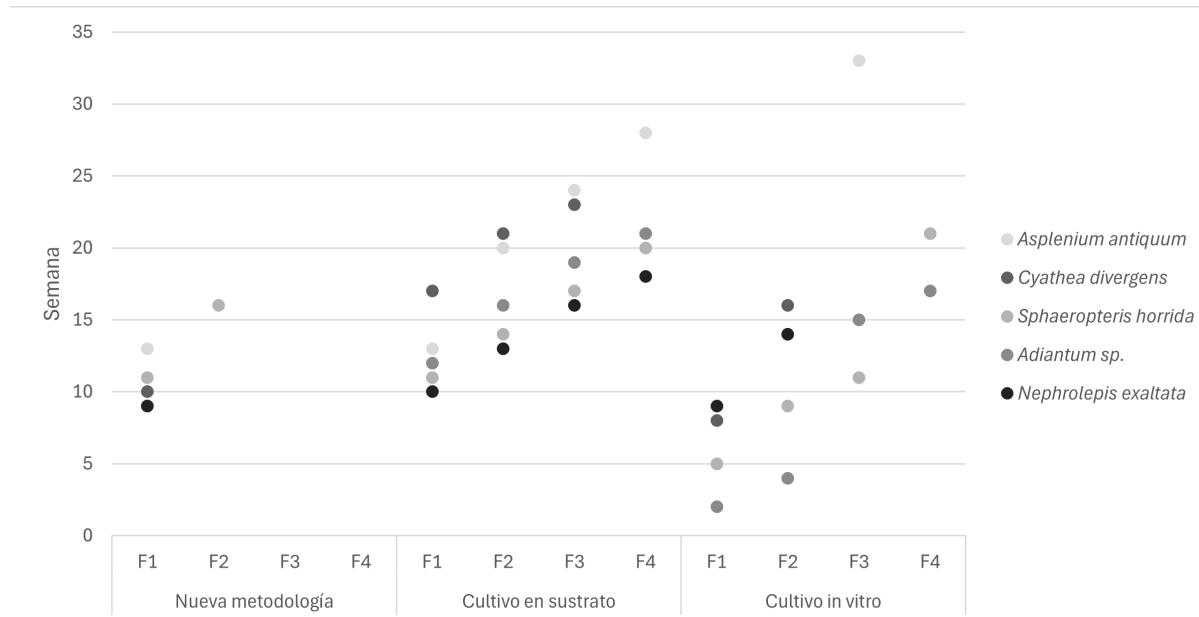
Nota. \*IN = siembra in vitro; SC = siembra convencional; NM = siembra nueva metodología.

alcanzaron la fase 1. Para el cultivo en sustrato y el sustrato sintético la germinación se dio en las primeras 2 a 15 semanas, mientras que en el cultivo in vitro el tiempo se redujo de 5 a 10 semanas. En la Figura 2 se observan las fenologías por especie por tratamiento.

Durante las 40 semanas de evaluación se obtuvieron un total de 3,309 helechos diferenciados de las cinco especies y los tres tratamientos evaluados. De estos el 98.25% se obtuvieron con el tratamiento del sustrato y únicamente un 1.75% con el método in vitro.

**Figura 2**

Fenologías observadas para las cuatro fases de desarrollo propuestas en las especies analizadas



En el sustrato se obtuvieron un total de 3252 organismos de cuatro especies, se obtuvieron únicamente 57 individuos en el laboratorio y no se formó ningún esporofito en el sustrato sintético (Tabla 1). Como se observa en la Tabla 2 el valor por individuo obtenido es

de Q1.10 para el cultivo en sustrato, y de Q95.06 para el cultivo in vitro. El costo de una planta cultivada en sustrato representa únicamente el 1.14% de los costos de una planta cultivada in vitro. El costo elevado de los esporofitos obtenidos in vitro se debe principalmente

**Tabla 1**

*Esporofitos generados por método de siembra y especie durante el estudio*

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

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

**Tabla 2**

*Resumen de los costos de producción*

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

a la realización de cuatro subcultivos del material obtenido de la germinación original incurriendo en altos gastos de mantenimiento y rotación de los cultivos.

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

## Discusión

Se ha evidenciado que los medios de cultivos bajos en nutrientes y/o azúcares, junto con un buen manejo espacial del cultivo, son óptimas para la propagación de *Cyathea aff. caracasana* (Narváez-Parra et al., 2013) y *Cyathea robertsiana* (Goller & Rybczynski, 2007). Ha habido intentos en diferentes ocasiones para la reproducción *in vitro* del género *Cyathea* (Narváez-Parra et al., 2013; Riaño Ospina et al., 2015; Randi & Hiendlmeyer, 2007; Rechenmacher et al., 2010; Shukla & Khare, 2012). El género parece responder bien a diferentes métodos de cultivo con la condición de bajas concentraciones de carbohidratos y/o nutrientes. Otros autores han reportado también un pH ligeramente ácido, entre 5.6 y 5.8 parece ser el más indicado para la germinación de los helechos en general, y clave para la germinación de *C. bicrenata* (Reyes et al., 2019) lo mismo que para *C. aff caracasana* (Narváez-Parra et al., 2013).

Como se observa en las Figuras 1 y 2, *Cyathea divergens* var. *tuerckheimii* no respondió bien al método Feldhoff, ni al método convencional, presentando bajos porcentajes de germinación y desarrollo. Esto pudo deberse a las concentraciones de nutrientes y a las condiciones de acidez a la que se encontraban los cultivos. El pH de la tela era de 6.6 debido al agua utilizada para humedecer la tela, mientras que el pH del peat-moss era de 5.9 y el del medio de cultivo M&S fue de 5.8. Así mismo la disponibilidad de nutrientes era

nula en el tratamiento de la tela y muy bajo en el tratamiento convencional, esto puede explicar la baja tasa de germinación en el sustrato, y el mejor rendimiento de la germinación en el laboratorio. En cambio, en el cultivo *in vitro* se obtuvo buen porcentaje de germinación, como se observa en las Figuras 1 y 2, aunque no se llegó a la fase esporofítica, esto puede sugerir que el ciclo de vida de este helecho requiere de más tiempo para madurar y desarrollarse en comparación con *S. horrida*.

*S. horrida* ha demostrado ser una especie de crecimiento más rápido en comparación con otros helechos arborescentes, así mismo lo distingue su particular tolerancia a cambios de temperatura más bruscos, exposición directa al sol por más tiempo y cambios de humedad (Briones & Riaño, 2014; Olsen, 2007). Esta plasticidad les confiere una mayor supervivencia ante los cambios del bosque nublado de donde son originarios (Briones & Riaño, 2014).

Como se observa en las Figuras 1 y 2 *S. horrida* presentó tolerancia a las diferentes condiciones de los tres tratamientos, diferentes niveles de pH y disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Tuvo un buen rendimiento en el sustrato y la diferenciación de los individuos a partir de un 4to subcultivo *in vitro* sugiere que en un subcultivo más se hubiera obtenido fácilmente hasta cuatro veces más esporofitos que en el cultivo convencional.

Para los fines de conservación de esta investigación, el costo de una planta producida *in vitro* no podrá competir con el costo de una planta producida en sustrato. Como se observa en las Tablas 1 y 2, el método de sustrato fue el más eficiente ya que, en las 40 semanas de experimentación, se obtuvieron más de 3,000 esporofitos de las 5 especies trabajadas, en comparación con 57 obtenidos en laboratorio en el mismo tiempo.

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

## Agradecimientos

Gracias a Corporación TAK Centroamérica, la Facultad de Agronomía (USAC) y el Jardín Botánico CECON-USAC por brindarme las instalaciones necesarias y equipo para esta investigación.

Al Ing. Estuardo Archila, a la Ing. Angela Meoño, al Dr. Jorge Mario Vargas y al botánico Uwe Feldhoff (QED) por su asesoría y colaboración en la obtención de datos y revisión de este trabajo.

## Contribución de los autores

Coordinación, elaboración y revisión del Documento: AMC

Diseño de la recolección de datos o del trabajo en campo: AMC

Recolección o contribución de datos o realización del trabajo de campo: AMC

Limpieza, sistematización, análisis o visualización de datos: AMC

Participación en análisis de datos, estructura y en la escritura del documento: AMC

## Materiales supplementarios

Este artículo no tiene archivos complementarios.

## Referencias

Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (Coord.). (2013). *Fundamentos de fisiología vegetal* (2013). (2.<sup>a</sup> ed.). McGrawHill.

Barros, A., Salinero, C., Vela, P., & Sainz, M. J. (2008). Método rápido para la propagación de helechos ornamentales. *Actas de Horticultura*, 52, 350-354.

Bernabe, N., Williams-Linera, G., & Palacios-Rios, M. (1999). Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud forest remnant: Spore germination and sporophyte survival and establishment. *Biotropica*, 31(1), 83-88. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.1999.tb00118.x>

Briones, O., & Riaño, K. (2014). Ecofisiología de helechos del bosque nublado. En *Botánica na América Latina* (pp. 212-222). <https://doi.org/10.13140/2.1.1835.8723>

Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biología* (7.<sup>a</sup> ed.). Médica Panamericana.

Christenhusz, M. J. M., & Chase, M. W. (2014). Trends and concepts in fern classification. *Annals of Botany*, 113, 571-594. <https://doi.org/10.1093/aob/mct299>

Escámez Pastrana, A. M. (1989). Los helechos: Elementos esenciales en la conservación de nuestra flora. *Aldaba*, (13), 79-118. <https://doi.org/10.5944/aldaba.13.1989.20147>

Escaso Santos, F., Martínez Guitarte, J. L., & Planelló Carro, M. del R. (2010). *Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal*. Pearson Educación. <https://www.biblionline.pearson.com/Pages/BookDetail.aspx?b=661>

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

Fernández, E., Casares, A., & Ordás, R. (2013). *Prácticas de biotecnología vegetal*. Universidad de Oviedo.

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

Goller, K., & Rybczyński, J. J. (2007). Gametophyte and Sporophyte of tree ferns in vitro culture. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76(3), 193-199. <https://doi.org/10.5586/asbp.2007.022>

Hoshizaki, B. J., & Moran, R. C. (2001). *Fern Grower's Manual*. Timber Press.

Jiménez Barrios, J. B. (2009). *Diversidad de helechos (Monilophyta) en las áreas protegidas del Corredor del Bosque nuboso, en Purulhá, Baja Verapaz* [Tesis de licenciatura, Universidad San Carlos de Guatemala]. <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/tesis/B202.pdf>

Jiménez Barrios, J. B. (2012). Los Helechos (Monilophyta: psilotopsida, equisetopsida, marattiopsida y polypodiopsida) de Guatemala. En E. B. Cano & J. C. Schuster (Eds.), *Biodiversidad de Guatemala* (Volumen 2, pp. 9-16). Universidad del Valle de Guatemala.

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

López-Romero, J. M., Riaño, K., & Briones, O. (2016). Germinación y frecuencia de esporofitos de dos especies simpátricas de Blechnum (Blechnaceae). *Acta Botanica Mexicana*, (117), 47-58. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1167>

Martín Gordo, D. A., Cárdenas González, O., & Pacheco, J. C. (2012). Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 49-62. <https://doi.org/10.22490/21456453.972>

Mehltreter, K., Walker, L., & Sharpe, J. (2010). *Fern ecology*. Cambridge University Press.

Muñiz Díaz de León, M. E., Mendoza-Ruiz, A., & Pérez-García, B. (2007). Usos de los helechos y plantas afines. *Etnobiología*, 5(1), 117-125.

Narváez-Parra, E., Jerez-Jaimes, J. H., & Mantilla-Serrano, J. E. (2013). Etapas de desarrollo in vitro del gametofito del helecho arborescente *Cyathea aff caracasana* (Klotzsch) Domin. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 11(2), 74-84.

Olsen, S. (2007). *Encyclopedia of garden ferns*. Timber Press.

Pence, V. C. (2015). Propagation and cryopreservation of *Asplenium scolopendrium* var. *americanum*, the American hart's-tongue fern. *American Fern Journal*, 105(3), 211-225. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-105.3.211>

Pérez-García, B., & Reyes-Jaramillo, I. (1993). Helechos: Propagación y conservación. *Ciencias*, 30, 10-17.

Ramírez, M. del R., Pérez-García, B., & Riba, R. (2000). El suelo... un banco natural de esporas y helechos. *Contacto S*, 36, 15-18.

Randi, A. M., & Hiendlmeyer, R. (2007). Response of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta Botanica Brasilica*, 21(4), 909-914.

Ranker, T., & Haufler, C. (2008). *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press.

Rechenmacher, C., Schmitt, J., & Droste, A. (2010). Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) under different pH conditions. *Brazilian Journal of Biology*, 70(4 suppl.), 1155-1160. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000600004>

Reyes, S. A., González, H., Castillo, A. M., Volke, V. H., Jacinto, C., Carvajal, C., & García, G. (2019). Importancia del pH y protocolo de desinfección en la germinación de esporas de *Cyathea bicrenata*. *BioTecnología*, 23(1), 22-31.

Riaño Ospina, K. R., Briones, O., & Pérez-García, B. (2015). Spore germination of three tree fern species in response to light, water potential, and canopy openness. *American Fern Journal*, 105(2), 59-72. <https://doi.org/10.1640/amfj-105-02-59-72.1>

Ruiz Robleto, J. M. (1995). *Reproducción y propagación de algunas especies de helechos arborescentes* [Tesis de licenciatura, Universidad del Valle de Guatemala]. <https://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/1330>

Rünk, K., & Zobel, M. (2009). Differences in post-emergence growth of three fern species could help explain their varying local abundance. *American Fern Journal*, 99(4), 307-322. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-99.4.307>

Salinas, M., Bahamondes, M., Muñoz, A., & Cartes, F. (2008). Resultados y lecciones en Producción comercial de helechos nativos. Serie: *Experiencia de Innovación Para El Emprendimiento Agrario*, 21, 28.

Schneider, H. (2012). Evolutionary morphology of ferns (Monilophytes). *The Evolution of Plant Form*, 45, 115-140. <https://doi.org/10.1002/9781118305881.ch4>

Seguí Simarro, J. M. (2010). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Universitat Politècnica de València.

Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (Comp.). (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Universidad Nacional de la Plata.

Shukla, S. P., & Khare, P. (2012). In-vitro mass multiplication of a threatened tree fern, *cyathea spinulosa* Wall. ex Hook. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 3(1), 15-23. <https://doi.org/10.13140/2.1.2282.8168>

Stadtmüller, T. (1986). *Los bosques nublados en el trópico húmedo. Una revisión bibliográfica*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

Turner, M. G., Gardner, R. H., & O'neill, R. V. (2001). *Landscape Ecology in theory and practice pattern and process*. Springer-Verlag.

Véliz Pérez, M. E. (2008). Diversidad florística de Guatemala. En C. Azurdia Pérez, F. García Barrios & M. M. Ríos Palencia (Eds.), *Guatemala y su diversidad: Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico* (Cap. 5; pp. 261-300). Consejo Nacional de Áreas Protegidas. [https://sip.conap.gob.gt/wp-content/uploads/2021/05/Libro-Guatemala-y-su-Biodiversidad\\_2008.pdf](https://sip.conap.gob.gt/wp-content/uploads/2021/05/Libro-Guatemala-y-su-Biodiversidad_2008.pdf)

Véliz Pérez, M. E., & Vargas Ponce, J. M. (2006). *Helechos arborescentes de Guatemala: Distribución, diversidad, usos y manejo*.