

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

**EVALUACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA *Phlebodium decumanum*  
(Willd.) J. Sm. EN CUATRO CONCENTRACIONES DE MEDIO MS UTILIZANDO SOROS Y  
DE LA PROPAGACIÓN EN TRES SUSTRATOS UTILIZANDO ESPORAS**

GLENDIA IZABEL RODAS DIVAS

Guatemala, noviembre de 2010

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

EVALUACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA *Phlebodium decumanum*  
(Willd.) J. Sm. EN CUATRO CONCENTRACIONES DE MEDIO MS UTILIZANDO SOROS Y  
DE LA PROPAGACIÓN EN TRES SUSTRATOS UTILIZANDO ESPORAS

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

GLENDIA IZABEL RODAS DIVAS

En el acto de investidura como

INGENIERA AGRÓNOMA

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADA

Guatemala, noviembre de 2010

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR MAGNÍFICO

Lic. Carlos Estuardo Gálvez Barrios

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. MSc. Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL I	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL II	Ing. Agr. Walter Arnoldo Reyes Sanabria
VOCAL III	Ing. Agr. MSc. Oscar René Leiva Ruano
VOCAL IV	P. Forestal Axel Esau Cuma
VOCAL V	P. Contador Carlos Alberto Monterroso Gonzalez
SECRETARIO	Ing. Agr. MSc. Edwin Enrique Cano Morales

Guatemala, noviembre de 2010

Guatemala, noviembre de 2010

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

EVALUACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) EN CUATRO CONCENTRACIONES DE MEDIO MS UTILIZANDO SOROS Y DE LA PROPAGACIÓN EN TRES SUSTRATOS UTILIZANDO ESPORAS

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me suscribo.

Atentamente.

*"ID Y ENSEÑAD A TODOS"*

Glenda Izabel Rodas Divas

## ACTO QUE DEDICO

- A DIOS:** Energía suprema que me rodea y habita dentro de mí. Gracias por el don de la vida, por ser la fuerza diaria que me impulsa a levantarme cada mañana, por la oportunidad de llegar a esta parte del camino, guiar mis decisiones y ser parte de lo que soy.
- A MIS PADRES:** Quique y Mary. Por su apoyo incondicional en todo momento, por las alegrías, tristezas, enojos y preocupaciones que hemos compartido. Gracias por hacerme la persona que soy, por enseñarme tantas cosas, pero sobre todo, por traerme hasta aquí, ya que ustedes han sido la motivación principal para alcanzar todas mis metas. Los amo mucho.
- A MIS HERMANOS:** Julio y Juan. Gracias por ser mis amigos en todo momento, porque aunque tengamos nuestras diferencias, nos une un vínculo muy especial que nadie podrá romper nunca. Son unas personas muy especiales de las cuales siempre aprendo algo nuevo. Los quiero mucho y no se olviden de luchar siempre por lo que quieran alcanzar.
- A MIS ABUELOS:** Ana Dabroy (Q.E.P.D.)  
Liberato Rodas  
Blanca Castillo  
Raúl Divas  
Por sus enseñanzas en todo momento, por la sabiduría que irradian, porque siempre tienen una sonrisa y un abrazo caluroso. Recuerden siempre que los admiro y respeto por todo lo que han vivido. Los quiero mucho.
- A MI NOVIO:** Andrés Letona. Gracias por tu apoyo y compañía en todo momento, por tus consejos, por tu amistad y por ser una pieza fundamental en mi vida. Deseo siempre lo mejor para tu vida en todos los aspectos, profesional, familiar, personal y espiritual. Te amo.
- A MIS TÍOS Y TÍAS:** Gracias por todos sus consejos y apoyo. En especial a Susy, Dorita, Haroldo (Q.E.P.D.) y mis tías Cony y Mary.
- A MIS PRIMOS Y PRIMAS:** Gracias por los momentos compartidos y el apoyo en todo momento, especialmente a Wendy, Byron, Vivi, Sofía y Stephanie. Y ahora un nuevo retoñito que se llama Santiago, cuya sonrisa ilumina mi vida cada día.
- A MIS AMIGOS Y AMIGAS:** Lily López, Rudy Galindo, Rubén Granados, Gabriel Gálvez, Irene Muñoz, Paola Cedillo, Sabrina Posadas, Luis Camposeco, Paty Calí, Jorge Sandoval. Mauricio Paredes, Dimitri Pinto, Esvyn Villagran, Carlos Loarca. Gracias a todos y cada uno de ustedes por los momentos compartidos, por los consejos, por la ayuda incondicional, por los buenos y malos momentos y por animarme en múltiples ocasiones. Los quiero mucho a todos y todas y les deseo lo mejor siempre ingenieros e ingenieras. Idania Castillo y Silvia Boror, gracias por haber crecido a mi lado y por ser un ejemplo a seguir. Te quiero mucho.  
Izabel Oliva, Marilyn Ríos, Leo Cipriani, por su amistad y hacer del lugar de trabajo un lugar muy ameno.

## **TESIS QUE DEDICO**

A:

MI PATRIA GUATEMALA, lugar que me vio nacer. A pesar de todas tus heridas, te sueño libre y llena de prosperidad.

MI FAMILIA Y AMIGOS.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, grande entre las grandes.

FACULTAD DE AGRONOMÍA, lugar que forjó mi camino profesional.

ESCUELA NORMAL DE MAESTRAS DE EDUCACIÓN PARA EL HOGAR "MARION. G. BOCK", ya que tus aulas me inspiraron a ser una trabajadora de campo.

INSTITUTO EXPERIMENTAL DE EDUCACIÓN MEDIA "DR. CARLOS F. MORA", por formarme durante mi adolescencia y de donde guardo muy gratos recuerdos.

INSTITUTO DE NUTRICIÓN DE CENTROAMÉRICA Y REPÚBLICA DOMINICANA -INCAP-, por abrirme las puertas para realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado -EPS- y permitir desarrollarme como una profesional.

## AGRADECIMIENTOS

A:

MIS ASESORES, Ing. Agr. Vicente Martínez e Ing. Agr. Mak Milan Cruz, por ser una guía durante todo este proceso y motivarme a culminar con éxito esta investigación.

MI SUPERVISOR DE EPS, Ing. Agr. Guillermo Méndez, por ayudarme durante toda esta etapa, aconsejándome, guiándome y apoyándome siempre.

Al Ing. Agr. Juan José Castillo, por su amistad, apoyo y confianza en mí.

A los ingenieros Rolando Lara, Manuel Martínez, Álvaro Hernández, Francisco Vásquez, Enrique Flores, Marco Estrada Muy, Walter Tello, Dr. Edin Orozco. Por motivarme en cada una de sus clases a ser una mejor profesional.

A don Maquito y doña Lupita, por ayudarme incondicionalmente durante toda mi estancia en esta facultad.

A las familias Sánchez Recinos, García De León, Letona Diemecke, Letona Urbizu. Por abrirme las puertas de sus hogares y compartir muy gratos momentos.

A los señores Francisco Patzan, Hilario, Alicia Coc, Susana Canel, Cristina Subuyuj, por enseñarme más de lo que yo pude haberles enseñado. Mi más grande respeto y admiración para ustedes.

A Orquídeas S y M por brindarme los permisos necesarios para concluir la presente investigación.

Son muchas las personas a las cuales de una u otra manera tengo que agradecer, cada uno en un momento determinado de mi vida, en mi formación personal, en mi formación espiritual, en mi formación profesional. Gracias a todos y todas, y deseo siempre que estén rodeados y rodeadas de muchas bendiciones.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 MARCO CONCEPTUAL.....	5
3.1.1 Generalidades de los helechos.....	5
3.1.2 Características ecológicas de la Calahuala.....	5
3.1.2.1 Hábitat.....	5
3.1.2.2 Altitud.....	5
3.1.2.3 Suelo.....	5
3.1.2.4 Requerimiento de luz.....	6
3.1.3 Distribución geográfica.....	6
3.1.4 Taxonomía de la calahuala.....	6
3.1.5 Ciclo vital de un helecho.....	6
3.1.6 Cultivo de esporas in vitro.....	7
3.1.7 Contaminación de los medios de cultivo.....	9
3.1.7.1 Contaminación por microorganismos externos.....	9
3.1.7.2 Contaminación por microorganismos internos.....	10
3.1.8 Técnicas para evitar la contaminación.....	10
3.1.9 Etapas de la micropropagación.....	10
3.1.9.1 Asepsia del medio de cultivo.....	10
3.1.9.2 Multiplicación.....	11
3.1.10 Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS).....	11
3.1.10.1 Sales inorgánicas.....	11
A. Macronutrientes.....	11
B. Micronutrientes.....	11
3.1.10.2 Vitaminas.....	11
A. Tiamina.....	11
B. Piridoxina.....	12
C. Ácido pantoténico.....	12
D. Ácido fólico.....	12
E. Riboflavina.....	12
F. Vitamina E.....	12
G. Mio-inositol.....	12
3.1.10.3 Aminoácidos.....	12
3.1.10.4 Carbohidratos.....	13
3.1.10.5 Agua.....	13
3.1.10.6 Agentes solidificantes.....	13
3.1.11 Sustratos.....	14
3.1.11.1 Funciones.....	14
3.1.11.2 Características de un sustrato.....	14
3.1.11.3 Características que NO debe tener un sustrato.....	14
3.1.12 Sphagnum Peat Moss.....	14

3.1.12.1	Taxonomía.....	14
3.1.12.2	Características.....	15
3.1.12.3	Usos.....	16
3.1.12.4	Ventajas.....	16
3.1.12.5	Análisis químico.....	17
3.1.12.6	Recomendaciones de manejo.....	17
3.1.13	Cascarilla de arroz.....	17
3.1.14	Arena.....	18
3.2	MARCO REFERENCIAL.....	20
3.2.1	Localización del experimento.....	20
3.2.2	Características de <i>Phlebodium decumanum</i> Willd.....	20
3.2.3	Descripción botánica de <i>Phlebodium decumanum</i> Willd.....	20
3.2.4	Taxonomía de <i>Phlebodium decumanum</i> Willd.....	21
3.2.5	Nombres comunes.....	21
3.2.6	Sinonímias.....	21
3.2.7	Distribución geográfica.....	22
3.2.8	Usos medicinales y propiedades demostradas.....	22
3.2.9	Condiciones ecológicas.....	22
3.2.10	Propagación.....	23
3.2.10.1	Por estacas o tejido de planta madre (rizoma).....	23
A.	Consideraciones para la propagación por rizoma.....	23
3.2.10.2	Por esporas.....	23
A.	Consideraciones para la siembra de esporas.....	24
3.2.11	Área de colecta.....	24
4.	OBJETIVOS.....	26
4.1	Objetivo general.....	26
4.2	Objetivos específicos.....	26
5.	HIPÓTESIS.....	27
6.	METODOLOGÍA.....	28
6.1	Fase de campo.....	27
6.1.1	Manejo agronómico de las plantas donantes de soros.....	28
6.1.1.1	Riego.....	28
6.1.1.2	Control fitosanitario.....	28
6.2	Fase de laboratorio.....	29
6.2.1	Propagación de Calahuala <i>in vitro</i> .....	29
6.2.1.1	Área experimental.....	29
6.2.1.2	Instrumentos, equipo, cristalería y reactivos.....	29
A.	Instrumentos.....	29
B.	Equipo.....	30
C.	Cristalería.....	30
D.	Reactivos.....	30
6.2.1.3	Manejo del experimento.....	30
A.	Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog 1,962.....	30
B.	Preparación de las unidades muestrales.....	32
C.	Obtención y desinfección de soros de las plantas donantes.....	32
D.	Siembra de los soros en los recipientes.....	33

E. Incubación de los medios de cultivo.....	32
F. Licuado de los prótalos.....	34
6.2.1.4 Diseño experimental.....	34
A. Diseño experimental y distribución de las unidades Experimentales.....	34
B. Tratamientos.....	35
C. Modelo estadístico .....	36
D. Variables de respuesta.....	37
E. Toma y registro de datos.....	37
F. Análisis de la información.....	39
6.2.2 Propagación de Calahuala en condiciones semiestériles.....	39
6.2.2.1 Área experimental.....	39
6.2.2.2 Instrumentos, equipo, cristalería y reactivos.....	39
A. Instrumentos.....	39
B. Equipo.....	39
C. Otros.....	39
6.2.2.3 Manejo del experimento.....	40
A. Recolección de esporas.....	40
B. Preparación de medios de siembra.....	40
C. Siembra de esporas.....	42
D. Germinación de esporas.....	43
E. Trasplante de esporas germinadas.....	43
6.2.2.4 Diseño experimental.....	44
A. Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales.....	44
B. Tratamientos.....	44
C. Modelo estadístico.....	45
D. Variables de respuesta.....	45
E. Toma y registro de datos.....	46
F. Análisis de la información.....	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
7.1 Propagación de Calahuala <i>in vitro</i> .....	48
7.1.1 Porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros.....	50
7.1.2 Número de esporofitos jóvenes.....	53
7.1.3 Altura promedio de esporofitos jóvenes.....	53
7.2 Propagación de Calahuala en condiciones semiestériles.....	54
7.2.1 Porcentaje de germinación de esporas a nivel de prótalo en condiciones semiestériles.....	58
7.2.2 Número de esporofitos jóvenes en condiciones semiestériles.....	60
8. CONCLUSIONES.....	63
9. RECOMENDACIONES.....	64
10. BIBLIOGRAFÍA.....	65
11. ANEXOS.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Fronda de ( <i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J. Sm.) con sus respectivos soros.....	7
Figura 2.	Ciclo biológico de los helechos.....	8
Figura 3.	Planta de <i>Sphagnum quinquefarium</i> (Lindb.) Warnst.....	15
Figura 4.	Canalización del agua en la cascarilla de arroz.....	18
Figura 5.	Ubicación del área de colecta de la muestra donante de soros y esporas. Municipio de Melchor de Mencos, Petén.....	25
Figura 6.	Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) en cuatro concentraciones: 25%, 50%, 75% y 100%.....	32
Figura 7.	Extracción de soros de una pina de Calahuala ( <i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J. Sm.).....	32
Figura 8.	Soros colocados en medio de cultivo MS.....	33
Figura 9.	Ubicación de las unidades muestrales.....	34
Figura 10.	Secuencia para la obtención de esporofitos de Calahuala.....	35
Figura 11.	Distribución de las unidades experimentales para la propagación de Calahuala <i>in vitro</i> .....	36
Figura 12.	Fronda de calahuala lista para colocarse sobre papel blanco....	40
Figura 13.	Aspersión de fertilizante foliar a sustratos para humedecimiento.....	41
Figura 14.	Colocación de sustrato dentro de las bandejas.....	42
Figura 15.	Colocación de tratamientos bajo fuente de luz.....	43
Figura 16.	Ubicación de las unidades muestrales conteniendo los prótalos ya trasplantados.....	44
Figura 17.	Distribución de las unidades experimentales para la propagación de Calahuala en condiciones semiestériles.....	45
Figura 18.	Germinación de esporas contenidas en soros de Calahuala a los 40 días después de la germinación.....	48
Figura 19.	Masa de prótalos a los 90 días después de la siembra de esporas contenidas en soros de Calahuala, previo al licuado de los mismos.....	49
Figura 20.	Formación de esporofitos de Calahuala a los 30 días después del licuado de prótalos.....	49
Figura 21.	Formación de esporofitos de Calahuala a los 160 días después del licuado de prótalos.....	50
Figura 22.	Conteo de esporofitos de Calahuala a los 160 días después del licuado de prótalos.....	50
Figura 23.	Grafica de la prueba múltiple de Tukey para la variable porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros.....	52
Figura 24.	Grafica de la prueba múltiple de Tukey para la variable altura promedio de esporofitos jóvenes.....	54
Figura 25.	Germinación de esporas de Calahuala.....	56
Figura 26.	Diferencia en cuanto a formación de prótalos de Calahuala entre tratamientos a los 55 días de siembra.....	57
Figura 27.	Estimación de áreas de los tratamientos 1 y 2, por medio de una rejilla de puntos, para determinar número aproximado de prótalos.....	57

Figura 28.	Rosetas de prótalos trasplantadas a nuevos sustratos.....	58
Figura 29.	Grafica de la prueba múltiple de Tukey para la variable porcentaje de germinación de esporas de Calahuala a nivel de prótalo.....	59
Figura 30.	Rosetas de prótalos deterioradas sobre cascarilla de arroz mullida.....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Cantidad requerida para preparar una mezcla de plantación con Peat moss.....	17
Cuadro 2.	Dosis en mg/l de cada componente del medio MS para cada tratamiento.....	31
Cuadro 3.	Formato para el registro de la producción de prótalos y tiempo por unidad experimental.....	38
Cuadro 4.	Formato para el registro de esporofitos jóvenes y altura promedio por unidad experimental.....	38
Cuadro 5.	Formato para el registro de esporas germinadas como prótalos y tiempo por unidad experimental.....	46
Cuadro 6.	Resumen del análisis de varianza para las variables de la propagación de calahuala <i>in vitro</i> .....	51
Cuadro 7.	Prueba múltiple de medias de Tukey con una significancia al 5% para las variables de la propagación de calahuala <i>in vitro</i> .....	52
Cuadro 8.	Resumen del análisis de varianza para el porcentaje de germinación de esporas en condiciones semiestériles.....	59
Cuadro 9.	Prueba múltiple de Tukey con una significancia al 5% para el porcentaje de germinación de esporas de calahuala a nivel de prótalo.....	59
Cuadro 10.	Estudio de mercado de la Calahuala ( <i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J. Sm.).....	70
Cuadro 11.	Comercialización de Calahuala vía internet .....	71
Cuadro 12.	Registro de la producción de prótalos y tiempo de germinación por unidad experimental .....	75
Cuadro 13.	Registro de esporofitos jóvenes y altura promedio por unidad experimental .....	75
Cuadro 14.	Registro de esporas germinadas como prótalos y tiempo por unidad experimental.....	76

**EVALUACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE CALAHUALA (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) EN CUATRO CONCENTRACIONES DE MEDIO MS UTILIZANDO SOROS Y DE LA PROPAGACIÓN EN TRES SUSTRATOS UTILIZANDO ESPORAS**

**ASSESSMENT MICROPROPAGATION OF CALAHUALA (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) IN FOUR CONCENTRATIONS OF CULTURE MEDIUM MS USING SORUS AND THE PROPAGATION IN THREE SUBSTRATES USING SPORES**

**RESUMEN**

Las propiedades medicinales que se le atribuyen a *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. han propiciado la extracción desmedida del ambiente en el que se encuentra, lo que causa un daño a los rizomas y frondas, provocando un manejo no sostenible. Actualmente esta especie ya es sometida a siembra, en donde se requiere aprovechar los rizomas al máximo, pero muchas veces, parte de ese rizoma se utiliza para hacer una nueva siembra, reduciendo su rendimiento, esto hace necesario encontrar una metodología que permita la reproducción masiva de esta planta y contar así, con nuevas plántulas al momento de reponer las que se cosechen.

El cultivo *in Vitro* permite la obtención de plántulas libres de plagas y microorganismos patógenos, la reducción de costos y tiempo, la producción masiva en cualquier época del año y en espacios reducidos, así como la producción a escala. Es por ello que en la primera fase de estudio, se evaluaron cuatro concentraciones de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962): al 100%, 75%, 50%, 25% para determinar el éxito de germinación y de formación de esporofitos. Seguidamente se contó con una segunda fase donde se trabajó en condiciones semiestériles para la germinación de esporas, esto utilizando tres tipos de sustratos: peat moss, arena blanca y cascarilla de arroz, y así, encontrar el más adecuado para la propagación de la misma.

Los resultados obtenidos en cuanto al procedimiento de cultivo *in Vitro*, indicaron que a menor concentración de sales en el medio de cultivo MS, se obtiene el mayor porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm., específicamente en la concentración al 25%, no así, en cuanto al número de esporofitos

desarrollados, ya que éste es el mismo en cualquiera de las cuatro concentraciones evaluadas.

En cuanto a la germinación de esporas en condiciones semiestériles utilizando tres tipos de sustratos, el porcentaje de germinación es mayor en *Sphagnum* spp. (peat moss), el cual posee, según análisis químico, el pH más ácido y el contenido de materia orgánica más alto de los sustratos evaluados. La formación de esporofitos no se llevó a cabo en ninguno de los tres sustratos, por lo que se recomienda evaluar dosis y frecuencias de aplicación de fertilizante foliar y fungicida, después de la formación de prótalos, ya que las dosis utilizadas pudieron inhibir la fecundación de los gametos sexuales. Para ello se deberá utilizar específicamente *Sphagnum* spp. (peat moss) u otro sustrato que proporcione un pH ácido.

## 1. INTRODUCCIÓN

La República de Honduras es el único productor en el mundo del género *Phlebodium* y aproximadamente tiene unos 50 años de estar en el mercado europeo. En Guatemala, el 60 por ciento de la producción de calahuala se destina al mercado internacional, principalmente Estados Unidos y Europa. Las exportaciones se iniciaron hace aproximadamente 20 años; en total, suman alrededor de 30 ton/año, en tanto que el mercado local consume 20 ton/año. El ingreso bruto generado por las exportaciones de calahuala superan los US\$EE.UU 140,000/año, y el consumo en el mercado local genera ingresos por US\$EE.UU 95,000 (Robles, 2000).

Entre las principales especies de calahuala utilizadas con fines medicinales se pueden mencionar *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger. La calahuala *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. es un cultivo que ha tomado gran importancia económica en Guatemala debido a que es una planta con propiedades medicinales que se emplea para tratar anemia, artritis, cáncer de estómago, dolores renales, además de poseer propiedades depurativas, antialzheimer y antipsoriasis, y de ayudar a regular las defensas del organismo al deprimirlas en casos excesivos como las alergias, o aumentarlas cuando hay insuficiencias inmunológicas. La parte aprovechable de esta planta son las frondas y los rizomas que se preparan en una infusión (OEA y EXVECAM, 2006).

Según la Lista de Especies Amenazadas del año 2009 del Consejo Nacional de Áreas Protegidas, del género *Phlebodium* sp., solo *P. pseudoaureum* (Cav.) Lellinger se encuentra en peligro de extinción. Pero, aunque *P. decumanum* (Willd.) J. Sm. no se encuentre en dicha lista, ambas son utilizadas por sus propiedades curativas, razón por la cual, son extraídas de su hábitat de forma descontrolada, y de esta manera las plantas en sí (frondas y rizomas) son transportadas a diferentes empresas que las utilizan para la extracción de sus propiedades medicinales. Los agricultores no utilizan un método adecuado de recolección sino el simple extractivismo, alterando de esta manera el crecimiento de nuevas plantas lo cual conlleva a la extinción de las mismas.

En la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, se han realizado importantes estudios en cuanto a la propagación *in vitro* de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger, y ahora con *P. decumanum* (Willd.) J. Sm., se buscó determinar la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) más adecuada donde se obtuviera el mayor porcentaje de germinación así como el mayor número de esporofitos desarrollados en condiciones estériles y controladas que presenta el establecimiento de la propagación *in vitro*, para lo cual se utilizaron como explantes, los soros. Se determinó que el tratamiento con menor concentración de sales proporciona las mejores condiciones para la germinación de esporas contenidas en soros, mientras que para el número de esporofitos, no existe diferencia significativa entre tratamientos. Otra fase de la investigación consistió en la siembra de esporas en diferentes sustratos. En esta fase las condiciones fueron semiestériles y se evaluó el sustrato que presentara la mayor tasa de germinación de esporas y la mayor producción de esporofitos. Se determinó que el sustrato más adecuado para obtener el mayor porcentaje de germinación de esporas es el *Sphagnum* spp. (peat moss), pero desafortunadamente no se obtuvo respuesta para la formación de esporofitos en ninguno de los tres tratamientos. Dicha investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La calahuala *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm., se encuentra en climas cálidos, desde el sur de Florida (USA), hasta Argentina (Moran, 1996). En Guatemala crece silvestremente en los bosques subtropicales húmedos (Izabal, Alta Verapaz y Petén) en altitudes menores a los 700 m. Su mercado de exportación hacia España, ha hecho que algunos productores a gran escala dediquen área para su cultivo. Sin embargo, si no existe una producción masiva de nuevas plántulas que contribuya al aumento de su área de producción, se estará dependiendo de material silvestre, dañando a las poblaciones locales de dicha planta.

En los últimos años las propiedades medicinales que se le atribuyen han propiciado la importancia de este helecho, por lo que es extraído de su ambiente silvestre dañando la planta completa, es decir, rizomas y frondas, provocando que no sea un manejo sostenible. Asimismo, también es sometido a siembra, encontrándose en las primeras fases de domesticación y en donde se requiere aprovechar al máximo los rizomas, sin embargo, si parte de ese rizoma (aproximadamente el 30% de la planta) se utiliza para hacer una nueva siembra, el rendimiento baja, lo ideal es contar con nuevas plántulas que estén listas para reponer las que se cosecharán. De aquí que es de suma importancia definir la metodología que permita su propagación masiva, ya que la velocidad de regeneración natural no supera la velocidad de extracción.

Las investigaciones realizadas en cuanto a propagación *in vitro* con *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger en forma sexual y asexual a través de explantes, han brindado resultados muy satisfactorios, pero se necesita continuar con dichas investigaciones utilizando otras especies, en este caso *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm., para conocer de mejor forma este helecho y de tal manera encontrar la metodología de propagación a nivel comercial.

Cabe resaltar que en Honduras, se han realizado pruebas de propagación por esporas de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. en agar, pero actualmente se desconoce la propagación *in vitro* de dicha especie en el medio MS, para lo cual, se hace necesario realizar la presente investigación utilizando dicho medio, en cuatro concentraciones diferentes: al

100%, 75%, 50%, 25%, lo cual contribuyó a determinar el éxito de germinación y de formación de esporofitos en las distintas concentraciones y de esta forma se determinó la mejor para esta especie de calahuala. Asimismo, es requerido conocer y trabajar en condiciones semiestériles para la germinación de esporas utilizando peat moss, arena blanca y cascarilla de arroz, y de esa cuenta, encontrar el sustrato más adecuado para la propagación de la misma.

Al establecer la metodología más apropiada para la propagación de calahuala *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm., se obtendrán beneficios y ventajas tales como material vegetal libre de plagas y microorganismos patógenos, reducción de costos y tiempo; y principalmente la producción masiva en cualquier época del año y en espacios reducidos y producción a escala, condiciones ideales para la producción comercial.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 MARCO CONCEPTUAL

##### 3.1.1 Generalidades de los helechos

Existen alrededor de 10,000 especies nuevas de helechos de los cuales la mayoría pertenece al orden Polypodiales. Se encuentran en amplia variedad de ecosistemas, pero la mayoría de ellos se localiza en partes sombreadas, en sitios bien húmedos y en climas tropicales o subtropicales (Rosales, 2005).

Los helechos se pueden reproducir en forma sexual por esporas o asexual por rizomas. Sobre el envés de las hojas se forman estructuras llamadas soros, compuestas por grupos de esporas resguardados dentro de esporangios y que forman el principal mecanismo de reproducción de estas especies en forma natural (Rosales, 2005).

Los helechos son epífitos, es decir, crecen adheridos a otra planta o sustrato sin tomar alimento de su hospedero, solo humedad. Otra característica importante es que el prótalo constituye una planta autotrófica independiente que puede sostener incluso al embrión del esporofito durante los primeros estadios del desarrollo (Rosales, 2005).

##### 3.1.2 Características ecológicas de la calahuala

**-Hábitat.** Crece silvestre sobre troncos de árboles de *Quercus* spp. (encino), *Cupressus sempervirens* L. (ciprés), *Pinus pinaster* Ait. (pino), *Quercus robur* L. (roble), *Cedrela odorata* L. (cedro), *Ficus* sp. (amate), *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (corozo) y otros; además sobre suelo rocoso y caliza desintegrada (Andrade, 2003).

**-Altitud.** Se desarrolla en altitudes de 1200-2200 msnm (Andrade, 2003).

**-Suelo.** Como su crecimiento es epifito, por lo general se desarrolla sobre la materia orgánica que se encuentra en los troncos viejos o entre la base de las hojas de palmeras. Cuando crece en el suelo lo hace sobre lugares con materia orgánica y suelos rocosos (Andrade, 2003).

Martínez, Velásquez y Andrade consideraron mediante un análisis químico realizado al sustrato natural de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger, el pH de 5.7, lo cual mostraba

un sustrato relativamente ácido, ocasionado principalmente por los altos niveles de materia orgánica presentes (61.94%).

**-Requerimiento de luz.** Se desarrolla bajo sombra, soporta hasta un 60% de luz (Andrade, 2003).

### 3.1.3 Distribución geográfica

El helecho es nativo de Centro América, se localiza desde México hasta Sur América. En Guatemala se ha descrito en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, San Marcos, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Suchitepéquez y Zacapa (Andrade, 2003).

### 3.1.4 Taxonomía de la calahuala

*Phlebodium* (R. Br.) J. Sm. es un pequeño y conflictivo género de los trópicos del nuevo mundo. Los pteridólogos le han asignado a este género distinto valor taxonómico. Presl (1836) incluyó a algunas de sus especies, *Polypodium aureum* L., *P. areolatum* Willd. y *P. decumanum* Willd. en *Pleopeltis* Humb. & Bonpl. ex Willd. Diels (1899) consideró a *Phlebodium* una sección de *Polypodium* L., con las tres especies antes mencionadas por Presl. Christensen (1906, 1913, 1917, 1934) le asignó la categoría de subgénero, con las siguientes especies: *Polypodium aureum*, *P. decumanum*, *P. guatemalense* Klotzsch, *P. nematorhizon* D. C. Eaton y *P. pleurosorum* Kunze ex Mett. Autores más recientes como, Vareschi (1969) y Proctor (1989), han seguido el criterio de Christensen (*op. cit.*), mientras que Tryon & Tryon (1982) y Smith (1995) han ubicado a *Phlebodium* en la sinonimia de *Polypodium* (Meza, 2006).

### 3.1.5 Ciclo vital de un helecho

La planta del helecho representa la generación esporofito. La parte inferior de las frondas lleva a menudo áreas negruzcas o de color café o anaranjado llamadas soros, los cuales son un conjunto de esporangios que sostienen las esporas haploides (figura 1). Las células madres de las esporas sufren meiosis dentro del esporangio y producen las esporas, las cuales pueden ser del mismo tipo (homósporas) o de dos tipos diferentes (heterósporas), hecho que depende de la especie. Las diversas especies de helechos también difieren en la distribución, estructura y forma de soros y esporangios. En ciertos helechos, cada soro está

cubierto por una estructura llamada indusio. En algunos otros existen dos tipos de hojas: esporofitas, que llevan los soros y vegetativas que nunca producen soros.

Las esporas liberadas germinan en el medio húmedo y se desarrollan formando primero filamentos de células verdes con rizoides. Cada uno de estos filamentos forma un pequeño gametofito típico en forma de corazón llamado prótalo el cual es una lámina verde pluricelular. Posee rizoides, así como órganos sexuales femeninos y masculinos colocados en la superficie inferior. El gametofito maduro tiene aproximadamente 1/2 centímetro de diámetro y lleva arquegonios, semejantes a los de las briofitas, cerca de la muesca, mientras que los anteridios están dispersos entre los rizoides. En ciertas especies los anteridios y arquegonios se encuentran en gametofitos distintos. Los espermatozoides multiciliados son liberados del anteridio, nadan hacia el prótalo y penetran el arquegonio, ocurriendo así la fecundación. El cigoto o huevo resultante marca el principio de la generación esporofítica y es retenido dentro del arquegonio donde se desarrolla, formando primero un embrión y después un nuevo esporofito con raíces, tallos y hojas. Durante los primeros estados del desarrollo embrionario, hasta que aparecen las primeras raíces y hojas, este esporofito joven depende totalmente para su nutrición del diminuto gametofito.

Se puede observar con claridad el ciclo detallado en la figura 2.



Figura 1. Fronda de (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) con sus respectivos soros.

### 3.1.6 Cultivo de esporas *in vitro*

Las esporas de los helechos, son bastante pequeñas y pueden ser desinfectadas, algunas son resistentes a la humedad y por esto es importante adherir una solución húmeda de

hipoclorito, luego sacudir bien el recipiente que contiene las esporas durante la desinfección (Rosales, 2005).

Las esporas asépticas de los helechos pueden ser germinadas *in vitro*, si son colocadas en un medio semi-sólido, conteniendo una baja concentración de sales, y si son convenientemente sembradas dentro de tubos de ensayo largos. La composición exacta del medio de soporte para la germinación de esporas en realidad no es tan complicada, puede o debe contener una relativa baja cantidad de concentración de iones (Rosales, 2005).

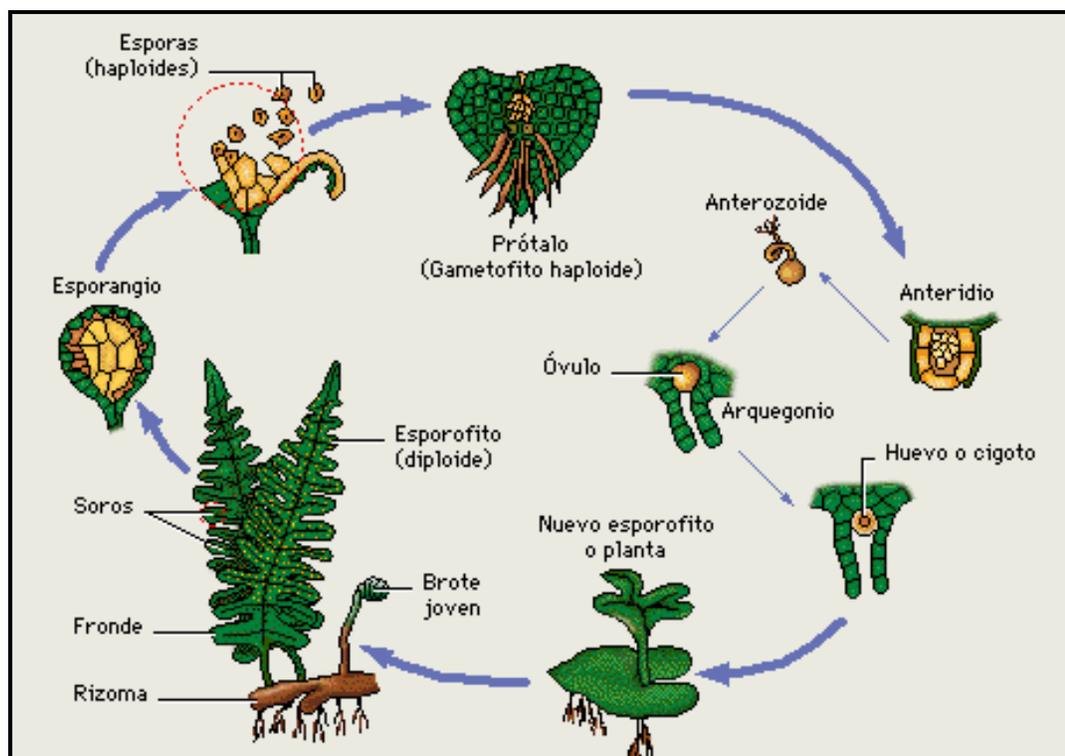


Figura 2. Ciclo biológico de los helechos (I.E.S. 2004).

Algunos medios que han sido utilizados con muy buenos resultados son medio Knudson (1946) con macronutrientes más micronutrientes Steeves *et al.* (1955), el medio de Moore (1903) Freeberg and Wetmore, (1957) y Millar y Millar (1961) el cual también puede ser improvisado por la adición de micronutrientes. Las sales de White (1954) medio que

probablemente puede ser satisfactorio. La adición de vitaminas o reguladores de crecimiento puede ser no necesaria. Los azúcares probablemente no son requeridos para la germinación

de esporas, pero el crecimiento de los gametofitos son mas rápidos cuando están presentes los azúcares. Una baja concentración de glucosa o sucrosa (e.g.2.5-20g/L) es usualmente empleada (Rosales, 2005).

Los cultivos son mantenidos en luz de baja irradiación. La óptima temperatura de incubación (16-25 °C) es variable de acuerdo al hábitat natural de las distintas especies de helecho. J.H Millar (1968) encontró que la germinación de algunas especies depende de la densidad a la cual las esporas fueron inoculadas dentro del medio (Rosales, 2005).

Las esporas germinadas dan a crecer prótalos no vasculares. Los esporofitos son usualmente producidos después en el mismo recipiente, pero no serán obtenidos en caso que no haya suficiente agua libre que permita el movimiento de los gametos masculinos. La fertilización puede ser asistida si una pequeña cantidad de agua esterilizada es introducida dentro de los recipientes de cultivo por medio de una jeringa en un estado apropiado del desarrollo del gametofito (Rosales, 2005).

Aunque el tejido gametofito no produzca esporofitos en su forma normal, puede todavía ser usada para la micropropagación por medio de la apogamia y aposporia. En algunas circunstancias, el tejido esporofítico de los helechos puede producir gametofitos sin primero producir esporas. Esta circunstancia es llamada aposporia. Similarmente los esporofitos algunas veces crecen del tejido gametofítico sin que haya sucedido fertilización lo que llamamos (apogamia) Estos eventos pueden ser rápidamente observados y manipulados durante el cultivo *in vitro* (Rosales, 2005).

### **3.1.7 Contaminación de los medios de cultivo**

La contaminación provoca cuantiosas pérdidas en la micropropagación masiva y hace ineficiente económicamente algunos procesos. La contaminación en cultivo de tejidos puede originarse de dos fuentes, por microorganismos externos o internos (Izquierdo, 2001).

### **3.1.7.1 Contaminación por microorganismos externos**

También llamada contaminación exógena, se encuentran en todas partes. Las esporas de estos organismos se mueven en las corrientes de aire, sobre partículas de polvo (Izquierdo, 2001).

### **3.1.7.2 Contaminación por microorganismos internos**

Los microorganismos internos, sistémicos o endógenos, son los que se encuentran en el interior del tejido del explante ya sea en espacios intercelulares o intracelulares (Izquierdo, 2001).

Dentro de los microorganismos que se describen como contaminantes del cultivo de tejidos se incluyen virus, bacterias y hongos. Para obtener buenos resultados en la micropropagación, se recomienda mantener controlada la contaminación en un rango de 10-20% (Izquierdo, 2001).

### **3.1.8 Técnicas para evitar la contaminación**

- Desinfestación personal (batas limpias, guantes, mascarilla, zapatos limpios, manos limpias y redecilla para el cabello).
- Desinfestación del área de trabajo con alcohol al 70% para la cámara de flujo laminar y las manos.
- Cristalería previamente esterilizada por autoclave (frascos para medios de cultivo, cajas petri, vidrios de reloj, etc.)
- Flameo de utensilios con mechero y alcohol al 90% (pinzas, agujas de disección, espátulas, tijeras, etc.)
- Flameo de cobertura de aluminio de los frascos que contienen los medios de cultivo.

### **3.1.9 Etapas de la micropropagación**

Las etapas que conlleva la micropropagación según Murashige 1974, están establecidas de la manera siguiente: establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación, enraizamiento y preparación del inóculo (aclimatación) para su transplante al suelo (Rosales, 2005).

### **3.1.9.1 Asepsia del medio de cultivo**

Los medios de cultivo son propicios para el desarrollo de microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente o llegan con el explante y reducen la calidad de las plantas producidas, además de competir por el espacio y alimento del cultivo, por lo cual es necesario que el explante se encuentre debidamente limpio y desinfectado. Los compuestos químicos más utilizados para la desinfección son el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloruro de mercurio, el cloro comercial y el alcohol en diferentes concentraciones (Rosales, 2005).

### **3.1.9.2 Multiplicación**

Esta fase se ve influenciada por las condiciones nutritivas y microclimáticas *in vitro*, y la ganancia de peso seco da como resultado la diferenciación de novo. La formación de nuevas células por división, producen esa ganancia en peso (Rosales, 2005).

## **3.1.10 Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1969)**

### **3.1.10.1 Sales inorgánicas**

Las sales inorgánicas se pueden dividir en dos grandes grupos, macronutrientes y micronutrientes tal como se indica a continuación.

#### **A. Macronutrientes**

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de carbono, hidrogeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente: N, P, K, Ca, Mg y S (Rosales, 2005).

#### **B. Micronutrientes**

Para una adecuada actividad metabólica, las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, B, Cu, Co, y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (Rosales, 2005).

### **3.1.10.2 Vitaminas**

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades (Rosales, 2005). Las vitaminas más empleadas son:

**A. Tiamina**

Conocida también como vitamina B1. Se añade como tiamina-HCL en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/L. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de las células vegetales (Rosales, 2005).

**B. Piridoxina**

Conocida también como vitamina B6. Se añade como piridoxina-HCL (Rosales, 2005).

**C. Ácido pantoténico**

Ayuda al crecimiento de ciertos tejidos (Rosales, 2005).

**D. Ácido fólico**

Disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P- amino benzoico (Rosales, 2005).

**E. Riboflavina**

Es inhibidor del crecimiento de las raíces (Rosales, 2005).

**F. Vitamina E**

Ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células (Rosales, 2005).

**G. Mio-inositol**

No es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico (Rosales, 2005).

**3.1.10.3 Aminoácidos**

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *in vitro*, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno

inorgánico proporcionado por el medio. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas *in vitro*: la glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-argina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L- cisteína es un agente reductor y actualmente utilizado como antioxidante en ciertos cultivos.

#### **3.1.10.4 Carbohidratos**

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. Sacarosa es el azúcar empleado universalmente. Le siguen en importancia la glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa y galactosa, manosa y lactosa. La concentración a la cual se utiliza la sacarosa es de 20 a 45 g/L.

#### **3.1.10.5 Agua**

El agua que se debe utilizar para el cultivo de tejidos debe ser bidestilada, tridestilada o desmineralizada. De cualquier forma el empleo de un destilador de vidrio es requerido para la destilación final.

#### **3.1.10.6 Agentes Solidificantes**

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de “soporte” para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que presenta el agar son:

- A. Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C, esto significa que este gel es estable a todas las temperaturas de incubación.
- B. El agar no es alterado por las enzimas vegetales.
- C. El agar no reacciona con los constituyentes del medio.
- D. No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio (Rosales, 2005).

Otros compuestos se han empleado para sustituir el agar, sin embargo, pocos han tenido éxito. Posiblemente el que ha alcanzado más popularidad es el “Gelrite”. Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que nos permitan sustituir este soporte (Rosales, 2005).

### **3.1.11 Sustratos**

Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, orgánico o inorgánico que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta (ANASAC, 2008).

#### **3.1.11.1 Funciones (ANASAC, 2008)**

- Sostén de la planta,
- retiene la humedad y los nutrientes y
- permite la oxigenación de las raíces.

#### **3.1.11.2 Características de un sustrato (ANASAC, 2008)**

- Debe retener la humedad pero además debe facilitar la salida de los excesos de agua,
- debe ser liviano,
- debe ser abundante, fácil de conseguir y trasportar,
- debe ser inerte,
- debe ser de bajo costo,
- debe permitir la aireación de las raíces y
- las partículas deben tener un tamaño no inferior a 0.2 mm y no superior a 7.0 mm.

#### **3.1.11.3 Características que no debe tener un sustrato (ANASAC, 2008)**

- No debe descomponerse o degradarse con facilidad,
- no debe contener elementos nutritivos,
- no debe contener microorganismos como bacterias u hongos perjudiciales a la salud de seres humanos o de las plantas,
- no debe contener residuos industriales o humanos y
- no debe contener polvo (partículas menores de 0.2 mm se eliminan por lavado).

### **3.1.12 Sphagnum Peat Moss**

#### **3.1.12.1 Taxonomía (Ramírez, 2003)**

Reyno : Plantae

Division : Bryophyta  
Clase : Equisetsida  
Subclase : Bryidae.  
Familia : Sphagnaceae.  
Genero : Sphagnum  
Section : Acutifolia  
Especie: *Sphagnum quinquefarium* (Lindb.) Warnst.

### 3.1.12.2 Características

El sustrato peat moss es filogenéticamente viejo y primitivo. Curiosamente no tienen flores. Tienen una parte viva y una parte muerta la superior está viva y la de abajo está muerta (Ramírez, 2008).



Figura 3. Planta de *Sphagnum quinquefarium* (Lindb.) Warnst.

No tienen raíces o por lo menos no tienen un verdadero sistema vascular de transmisión de fluidos, la parte de nutrición es independiente de la parte viva de la parte muerta (Ramírez, 2008).

Esta turba es indispensable para toda producción hortícola y para la preparación de los suelos para la plantación. Sus propiedades de absorción del agua y de retención de los

elementos nutritivos son esenciales para la salud de las plantas. Representa un aporte importante en materia orgánica.

Otras características son:

- Rica en materia orgánica (100% natural).
- Exenta de insectos y sin olores desagradables.
- Es amigable al ambiente (Ramírez, 2008).
- Gran capacidad de retención de agua.
- Retiene los elementos nutritivos cerca de las raíces.
- Acondiciona y mejora los suelos, dándoles mejor estructura (Ramírez, 2008).
- Generalmente posee un pH entre 3.4 y 4.8 (Ramírez, 2008).

### **3.1.12.3 Usos**

Este sustrato es recomendado para:

- Establecimiento de césped nuevo.
- Mantenimiento y tratamiento en superficie del césped.
- Preparación de suelos para:
  - ericáceas (azaleas, camelia, rododentro, etc.),
  - coníferas (pino, abeto, picea, etc.),
  - flores, plantas de bulbos y hortalizas,
  - rosales, árboles y arbustos

### **3.1.12.4 Ventajas**

- Airear las raíces en suelos pesados de arcilla (Ramírez, 2008).
- Agrega cuerpo al suelo arenoso (Ramírez, 2008).
- Acelera el proceso de compostaje, controla el aire y el agua en la pila de compost (Ramírez, 2008).
- Tarda algunos años en descomponerse (Ramírez, 2008).
- Reduce el riesgo de erosión.
- Enriquece todo tipo de suelos.
- De utilización agradable.

- Permite reducir la frecuencia de los riegos.
- Asegura a las plantas un crecimiento óptimo.
- Desarrolla al máximo el sistema radicular.

**Cuadro 1. Cantidad requerida para preparar una mezcla de plantación con Peat moss**

Opción	Turba	Tierra	Compost
A	1/3	2/3	-
B	1/3	1/3	1/3

### 3.1.12.5 Análisis químico

Nitrógeno total (N) .....0.05%

0.02% nitrógeno amoniacal

0.03% nitrógeno de nitrato

Fosfato disponible ( $P_2O_5$ ) .....0.02%

Potasa soluble ( $K_2O$ )..... 0.04%

Derivado de nitrato de amonio, fosfato de amonio, fosfato de calcio y sulfato de potasio (The Scottss Miracle Gro, 2006).

### 3.1.12.6 Recomendaciones de manejo

Aunque no es necesario proceso previo al uso, se recomienda humedecer el peat moss con agua tibia por 1 hora (The Scottss Miracle Gro, 2006).

### 3.1.13 Cascarilla de arroz

La cascarilla de arroz es un subproducto de la industria molinera, que resulta abundantemente en las zonas arroceras de muchos países y que ofrece buenas propiedades para ser usado como sustrato. Entre sus principales propiedades físico-químicas tenemos que es un sustrato orgánico de baja tasa de descomposición, es liviano, de buen drenaje, buena aireación y su principal costo es el transporte. El principal inconveniente que presenta la cascarilla de arroz es su baja capacidad de retención de humedad y lo difícil que es lograr

el reparto homogéneo de la misma (humectabilidad) cuando se usa como sustrato único en camas o bancadas (Calderón, 2002).



**Figura 4.** **Canalización del agua en la cascarilla de arroz.** Al agregar agua por encima a la cascarilla de arroz, esta se "canaliza" y se producen zonas muy húmedas al lado de zonas muy secas. Tomado de Calderón (2002).

De acuerdo a sus características físico-químicas en China por ejemplo, por tratarse de un material orgánico, se utiliza para regenerar las tierras de cultivos a través de compostas (abono); en Colombia, por su poder calorífico, se usa como combustible en ladrilleras y en México y Guatemala, por sus características físicas, se emplea en granjas avícolas generando camas donde se engorda a los pollos (Salgado, 2004).

### 3.1.14 Arena

La arena es una de las sustancias más utilizada en la mezcla de sustratos, aunque se emplea en pequeñas cantidades. La arena mejora la estructura del sustrato, y a la vez aporta peso al mismo (ANASAC, 2008).

Es un material de naturaleza silíceo y de composición variable, que depende de los componentes de la roca silicatada original. Puede proceder de las canteras o de ríos. La arena es una de las sustancias más utilizada en la mezcla de sustratos, aunque se emplea en pequeñas cantidades. La arena mejora la estructura del sustrato, y a la vez aporta peso al mismo. Las arenas utilizadas no deben contener elementos nocivos tales como sales, arcillas

o plagas. La granulometría no debe ser gruesa. La arena de río, que es la mejor, debe estar limpia para ser utilizada en sustratos. La arena utilizada en construcción no es buena porque lleva mucha arcilla y se compacta. Las que proporcionan los mejores resultados son las arenas de río (ANASAC, 2008).

Sus principales características son:

- Su granulometría más adecuada oscila entre 0.5 y 2.0 mm de diámetro.
- Su densidad aparente es similar a la grava (que oscila entre 1.5-1.8 kg/m<sup>3</sup>).
- Su capacidad de retención del agua es media (20% del peso y más del 35% del volumen).
- Su capacidad de aireación disminuye con el tiempo a causa de la compactación.
- Su capacidad de intercambio catiónico es nula.
- Es relativamente frecuente que su contenido en caliza alcance el 8-10%.
- Algunos tipos de arena deben lavarse previamente.
- Su pH varía entre 4 y 8.
- Su durabilidad es elevada.
- Es bastante frecuente su mezcla con turba, como sustrato de enraizamiento y de cultivo en contenedores.

Generalmente, la arena se mezcla con sustrato orgánico para mejorar las características físicas de la mezcla (densidad aparente y retención de humedad) (ANASAC, 2008).

La arena también se utiliza como mejorador de suelo. Principalmente ayuda a la planta a mejorar la infiltración de agua, oxígeno y nutrientes hacia las raíces. Hay especies que requieren mejor drenaje, como es el caso de las cactáceas, y otras que necesitan mayor retención de agua, en este caso menor cantidad de arena (en la mezcla del sustrato) (ANASAC, 2008).

La arena blanca originaria de piedra pómez es utilizada comúnmente para mejorar la estructura en suelos y para mezclas en bolsas y macetas usadas en propagación, germinación, etc. Cuando son extraídas ya sea de los ríos o de las canteras, son trituradas y clasificadas según su tamaño, lo que da granos angulosos con aristas vivas, en contraposición

con granos redondeados en el primer caso. Generalmente utilizadas para mejorar el drenaje de otros sustratos o para aumentar la estabilidad de contenedores (densidad elevada), son también utilizadas solas como sustratos inertes en sistemas de cultivos hidropónicos (Andrade, 2003).

## **3.2 MARCO REFERENCIAL**

### **3.2.1 Localización del experimento**

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, dentro del campus central de la Ciudad universitaria Zona 12, Ciudad de Guatemala.

### **3.2.2 Características de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.**

Helecho nativo de zonas tropicales bajas con climas cálidos y lluviosos, se encuentra diseminado a lo largo de la costa atlántica de Honduras y Guatemala como epífita de la palma africana y el corozo aceitero. Crece obteniendo sus nutrientes de la materia orgánica que se acumula en las brácteas de las hojas de la palma. La agricultura intensiva, la limpieza química de los palmares y el uso tradicional han disminuido ostentablemente la existencia de esta planta (Vargas, 2004).

### **3.2.3 Descripción botánica de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.**

“Epífitas; rizoma 1-3 cm de ancho, las escamas 6-15 mm, densamente denticuladas; lámina glabra en el envés; pinnas 15-35 x 3.5-5, el ápice atenuado, acuminado” (Moran, 1996).

Para complementar la descripción anterior, Vargas (2004) menciona que es un helecho epífita que puede llegar a alcanzar hasta 1.3 metros de altura. Los frondes están divididos de forma pinada, ocupando un 60% del largo total de la planta. Cada pina tiene un promedio de 32 cm de largo y 4.8 cm de ancho. El promedio de soros en cada pina es de 780, ocupando un área equivalente al 21% de cada pina. El tallo es rizomatoso, protegido por una pelusa particular. Las raíces son siempre laterales. Tallos, raíces y hojas están siempre provistas de un sistema vascular completo formado por haces leñosos y liberianos.

*Phlebodium decumanum* y *P. pseudoaureum* (tratada como *P. aureum*) se entrecruzan en Honduras produciendo un híbrido con 74 cromosomas no apareados, 37 de los cuales son grandes y 37 son pequeños. El nombre *P. dictyocallis* (Fée) Mett. se representa como el híbrido, pero no se menciona haber visto el tipo. (Moran, 1996).

### 3.2.4 Taxonomía de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.

*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm., pertenece a la familia Polypodiaceae y se encuentra dentro de la siguiente clasificación (Moran, 1996).

Reino:	Plantae
División:	Pteridophyta
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Polypodiidae
Orden:	Polipodiales
Familia:	Polypodiaceae
Género:	<i>Phlebodium</i>
Especie:	<i>Phlebodium decumanum</i> (Willd.) J. Sm.

### 3.2.5 Nombres comunes

Calahuala (Guatemala), calaguala (Honduras), samambaia (Brasil), polipodio, calaguala (Perú) (Vargas, 2004).

### 3.2.6 Sinonímias

La última clasificación botánica llevada a cabo por el Dr. Cirilo Nelson en 1998 clasifica las dudas sobre la real taxonomía de este helecho, ubicándolo dentro del género *Phlebodium* fuera del género *Polypodium* como solía estar (Vargas, 2004).

Así, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. tiene y ha tenido las sinonímias: *Polypodium decumanum* Willd., *Phlebodium multiseriale* Moore & Houlston, *Chrysopteris dictyocallis* Fée, *Chrysopteris decumana* (Willd.) Fée.

### 3.2.7 Distribución geográfica

Moran (1996) menciona la distribución de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. desde el Sur de la Florida, Mesoamérica, Suramérica y en las Antillas, principalmente en zonas costeras.

Crece silvestre en *Elaeis guineensis* J. (palma africana) y *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. (corozo). Se ha encontrado con menos frecuencia en plantaciones de palma en Colombia, Ecuador y a alturas menores a 600 msnm (Vargas, 2004).

En Guatemala, se localiza generalmente en los departamentos del Petén, Izabal y al norte de Alta Verapaz, siendo el primero el que reporta la mayor presencia de esta especie vegetal, en los siguientes municipios: Melchor de Mencos, Santa Ana, Santa Elena, La Libertad, Poptún, Dolores, San Luis y Sayaxché. En el departamento de Izabal solamente se registra en el municipio de Morales. En el caso del departamento de Alta Verapaz, el municipio de Chisec es el que reporta esta especie vegetal de menor presencia (Xitumul, 2009).

### 3.2.8 Usos medicinales y propiedades demostradas

La raíz de la calahuala es utilizada por los campesinos para tratamiento de afecciones gastrointestinales y para tratamiento de la artritis, gota y afecciones renales. Científicamente, el extracto de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm., ha demostrado una potente actividad inmunoreguladora para tratamiento de inmunoagresiones (artritis, psoriasis, vitiligo, y dermatitis atópica y para tratamiento de pacientes inmunodeprimidos (VIH y cáncer). Ha demostrado disminuir el estrés oxidativo en pacientes con requerimientos altos de energía (deportistas). Simultáneamente se ha confirmado que está relacionado con la modulación del factor de Necrosis Tumoral (Vargas, 2004).

### 3.2.9 Condiciones ecológicas

*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. prefiere una ecología que le permita el control de la humedad viviendo como epífito en la palma africana. La sombra de la misma le permite protegerse de climas altamente lluviosos, manteniendo una humedad relativamente alta. Debido a la localización de las zonas lluviosas, su reproducción es escasa y relativamente

lento comparado con otros helechos encontrados en bosques de pino y cafetales (Vargas, 2004).

Se desarrolla bien en altitudes entre 0 – 700 msnm, con precipitaciones entre 1,000 – 3,000 mm al año y temperaturas cálidas que oscilan entre los 15 y 30 °C (Vargas, 2004).

En forma natural, se desarrolla en un sustrato de materia orgánica que se acumula en las brácteas de las palmas y corteza de los árboles. Presenta un buen drenaje y pH que oscila entre 4 y 6.5. Para la siembra en cultivo es ideal contar con un sustrato que asemeje las condiciones naturales, como mezclas de aserrín, tierra y arena (Vargas, 2004).

### **3.2.10 Propagación**

Se reproduce de dos maneras básicas: por rizomas y por esporas.

#### **3.2.10.1 Por rizoma**

Este método se le conoce como propagación asexual o vegetativa. La progenie o descendencia es genéticamente idéntica a la planta madre. Es el método más práctico y se efectúa haciendo cortes en el rizoma para formar estacas y una vez enraizado se obtiene una nueva planta en producción (Vargas, 2004).

#### **A. Consideraciones para la propagación por rizoma**

Se debe tener en cuenta el vigor del rizoma, el tamaño o longitud de los rizomas seccionados, el número de yemas por sección y la consistencia del rizoma, así como asegurarse que se encuentre libre de enfermedades (Vargas, 2004).

#### **3.2.10.2 Por esporas**

Este método es conocido como reproducción sexual, y en él la descendencia producida puede variar. Este método además de llevar más trabajo requiere de un período de tiempo considerable para obtener una planta en producción (Vargas, 2004).

### **A. Consideraciones para la siembra de esporas**

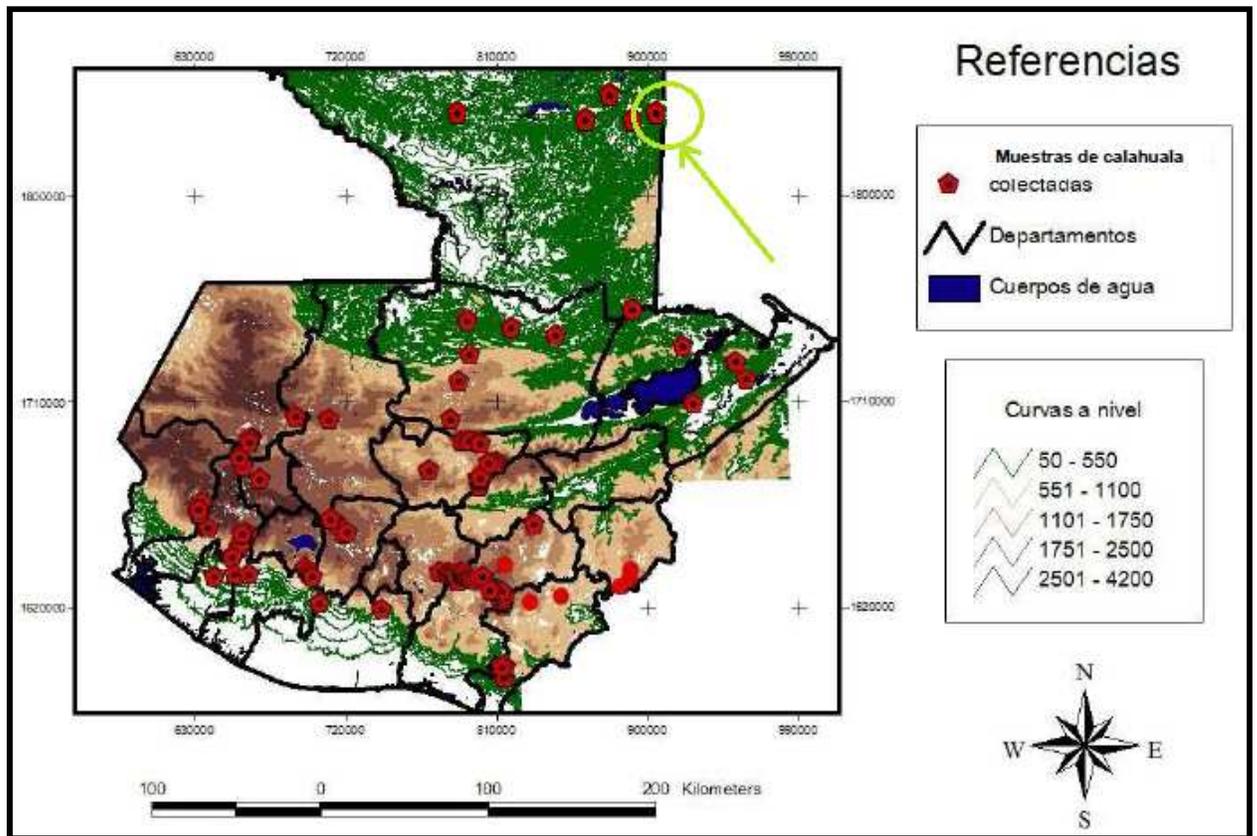
Se realiza la recolección de esporas en el campo y se hace una desinfección de éstas, luego se siembran en un medio de cultivo y se les proporcionan las condiciones adecuadas para la germinación, luz y humedad (Vargas, 2004).

Una vez que se desarrollan los prótalo que contienen los gametos masculino y femenino, se trasladan a bandejas con sustrato para que se lleve a cabo la fertilización con una adecuada humedad (Vargas, 2004).

Luego ocurre la fecundación, por medio de la cual, emergen embriones con rizoides simples los cuales dan origen a una nueva planta (Vargas, 2004).

#### **3.2.11 Área de colecta**

La muestra que sirvió para la obtención de soros y esporas, fue obtenida de la Colección Nacional de Calahuala, ubicada en la Facultad de Agronomía. Dicha muestra es procedente del departamento de Petén, Entre Monterrey y el Manantial, aldea el Naranjo, camino a Melchor de Mencos, Petén, en árboles de manaco y amate con hábito epífita (Xitumul, 2009). El municipio de Melchor de Mencos se encuentra a una altitud de 81 msnm, con latitud de 17°03'18" y longitud de 89°09'08".



(Tomado de Xitumul (2009)).

**Figura 5. Ubicación del área de colecta de la muestra donante de soros y esporas. Municipio de Melchor de Mencos, Petén.**

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

4.1.1 Evaluar la propagación *in vitro* de esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) proveniente de Melchor de Mencos, Petén, en diferentes concentraciones de medio Murashige y Skoog 1962 y la propagación de esporas en diferentes sustratos, en el laboratorio de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar la concentración del medio MS que presenta el mayor porcentaje de prótalos al cultivo *in vitro* de calahuala.

4.2.2 Determinar la concentración del medio MS que presenta la mayor producción de esporofitos al cultivo *in vitro* de calahuala.

4.2.3 Determinar el sustrato que proporcione las mejores condiciones para la producción de prótalos de calahuala en condiciones semiestériles.

4.2.4 Determinar el sustrato que proporcione las mejores condiciones para el desarrollo de esporofitos de calahuala en condiciones semiestériles.

## 5. HIPÓTESIS DE LOS EXPERIMENTOS

Ha:

5.1 Al menos una de las concentraciones de medio MS evaluadas inducirá a una mayor germinación de esporas contenidas en soros de cultivo de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) así como a una mayor formación de esporofitos.

Ha:

5.2 Al menos uno de los sustratos evaluados inducirá a una mejor germinación de esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

## 6. METODOLOGIA

La evaluación consistió de dos ensayos. El primero fue el establecimiento de los soros de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. en cuatro diferentes concentraciones de medio MS (100%, 75%, 50% y 25%), el cual se denomina propagación *in vitro*. El segundo ensayo, se realizó en condiciones semiestériles, con tres sustratos diferentes (peat moss, cascarilla de arroz mullida y arena blanca), en donde se sembraron las esporas del cultivo.

En cada ensayo se evaluó el tiempo de germinación de las esporas, tanto las contenidas en soros, como las que se encontraban libres, el porcentaje de producción de prótalos y el número de esporofitos desarrollados en los medios de cultivo y en los sustratos.

A continuación se describe el procedimiento para el establecimiento de los ensayos mencionados anteriormente.

### 6.1 Fase de campo

Los soros y esporas utilizados provienen del umbráculo ubicado en los campos del Centro Experimental Docente de Agronomía (CEDA), donde se encuentra la colección de especies de calahuala, obtenidas de las colectas realizadas en investigaciones anteriores en diferentes regiones del país. Este umbráculo permite una exposición a la luz indirecta del 50% por tratarse de helechos.

#### 6.1.1 Manejo agronómico de las plantas donantes de soros

El manejo agronómico de las plantas de calahuala donantes de soros, consistió en riegos y control fitosanitario, durante aproximadamente 25–30 días antes de su traslado al laboratorio.

##### 6.1.1.1 Riego

El riego se realizó aproximadamente cada dos días, con el fin de mantener una adecuada humedad dentro del sustrato.

##### 6.1.1.2 Control fitosanitario

Se realizó un control de enfermedades fúngicas con Benlate 50WP a razón de 0.30 g de producto/200 ml de agua, es decir en concentraciones de 0.15%.

El control bactericida se llevó a cabo con Agrimycin 16.5WP (Estreptomicina y Oxitetraciclina) en dosis de 0.20 g de producto/200 ml de agua (concentración de 0.1%).

También se llevó a cabo un control de ácaros por medio de Mitac 20EC (Amitraz) en concentración de 0.5%, es decir 1.0 ml de producto/200 ml de agua.

Los productos fueron aplicados dos veces por semana en 6 plantas aproximadamente, tanto en las frondas como por encima del sustrato.

Este control se llevó a cabo con el fin de desinfectar las plantas donantes, antes de ingresar al laboratorio y reducir las probabilidades de contaminación tanto en los medios de cultivo como en los sustratos.

## **6.2 Fase de laboratorio**

### **6.2.1 Propagación de calahuala *in vitro***

#### **6.2.1.1 Área experimental**

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. El mismo cuenta con condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y con los requerimientos adecuados que permitieron la ejecución de la presente investigación.

#### **6.2.1.2 Instrumentos, equipo, cristalería y reactivos**

Para la presente investigación se utilizaron instrumentos, equipo, cristalería, reactivos e insumos que a continuación se describen:

##### **A. Instrumentos**

Mechero de alcohol, para flamear instrumentos, pipetas, pinzas grandes y pequeñas, agujas de disección, tijeras, espátulas, mangos para bisturís, hojas de bisturís, pizetas, recipientes de plástico, papel parafilm, papel filtro.

## **B. Equipo**

Una unidad de cámara de flujo laminar, autoclave, balanza analítica, estufa-agitador, agitadores magnéticos, refrigeradora, potenciómetro, microondas, horno de esterilización en seco.

## **C. Cristalería**

Beaker, erlenmeyer, tubos de ensayo, balones aforados, recipientes para guardar soluciones concentradas, pipetas graduadas, cajas petri esterilizadas, recipientes de vidrio para los medios de cultivo (frascos de compota estériles).

## **D. Reactivos**

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Myo-inositol, Ácido nicotínico, Piridoxina-HCl, tiamina-HCl, glicina, Ácido cítrico, Sacarosa.

### **6.2.1.3 Manejo del experimento**

#### **A. Preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog 1,962**

La información sobre los componentes del medio de cultivo y de las concentraciones a emplear se presenta de una manera amplia en el cuadro 2.

Para la preparación del medio de cultivo se tomaron las alícuotas (mg/L) de cada solución patrón del medio Murashige y Skoog (1962) como se indica en el cuadro 2; es decir, se prepararon 500 ml de medio de cultivo MS al 100%, dentro de un beaker, el cual se colocó en una agitadora mecánica a fin de realizar una mezcla uniforme, de donde se tomaron los volúmenes requeridos para obtener las concentraciones establecidas, es decir, 75 ml de medio al 100% y se aforó hasta obtener 300 ml de solución (concentración al 25%), con 0.38 g de Phytigel. Luego se tomaron 150 ml de medio al 100% e igualmente se aforó hasta obtener 300 ml de solución (concentración al 50%), con 0.29 g de Phytigel. Asimismo se tomaron 225 ml de medio al 100% y se aforó hasta obtener 300 ml de solución (concentración al 75%), con 0.28 g de Phytigel. Finalmente, la concentración al 100% estuvo constituida por 300 ml de la solución sin diluir, agregándole igualmente 0.27 g de Phytigel. Las diferencias en las cantidades de Phytigel en los medios MS al 50%, 75% y 100% con respecto a las

cantidades utilizadas en el medio MS al 25% se debe a que mientras más diluido esté el medio, existe menor cantidad de sales, por lo que el Phytigel tendrá menores posibilidades de reaccionar formando un medio semi-líquido (Figura 6).

**Cuadro 2. Dosis en mg/L de cada componente del medio MS para cada tratamiento.**

Componentes del medio Murashige y Skoog	DOSIS DE CADA COMPONENTE (mg/L)			
	T1 = 100%	T2 = 75%	T3 = 50%	T4 = 25%
Macronutrientes				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1900.000	1425.000	950.000	475.000
KNO <sub>3</sub>	1650.000	1237.500	825.000	412.500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.000	127.500	85.000	42.500
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	370.000	277.500	185.000	92.500
Micronutrientes A 1000 X				
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.250	0.188	0.125	0.062
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	4.650	3.100	1.550
MnSO <sub>4</sub> • 4H <sub>2</sub> O	22.300	16.725	11.150	5.575
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	8.600	6.450	4.300	2.150
Micronutrientes B 5000 X				
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.019	0.013	0.006
CoCl • 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.019	0.013	0.006
Ioduro de potasio 1000 X				
KI	0.830	0.623	0.415	0.207
Cloruro de calcio 10 X				
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	440.000	330.000	220.000	110.000
Myo-inositol 100 X				
Myo - inositol	100.000	75.000	50.000	25.000
Solución de hierro 100 X				
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	27.800	20.850	13.900	6.950
Na <sub>2</sub> EDTA	37.300	27.975	18.650	9.325
Vitaminas 1000 X				
Thiamina – HCL	0.100	0.075	0.050	0.025
Ácido nicotínico	0.500	0.375	0.250	0.125
Glicina	2.000	1.500	1.000	0.500
Piridoxol hidroclorado	0.500	0.375	0.250	0.125



**Figura 6.** Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) en cuatro concentraciones: 100%, 75%, 50% y 25%.

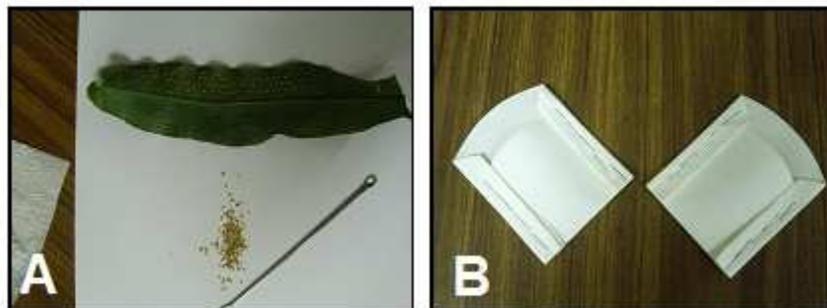
### **B. Preparación de las unidades muestrales**

Se procedió al llenado de los recipientes de vidrio con capacidad de 125 ml, agregando 20 ml de medio.

### **C. Obtención y desinfección de soros de las plantas donantes**

Los soros se colectaron de las plantas donantes del umbráculo ubicado en el CEDA, después de 25 a 30 días de iniciado el control de plagas y enfermedades. Se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas desinfectadas con alcohol etílico al 70%, asperjado en su interior.

En el laboratorio se procedió a extraer uno a uno los soros de las pinas con una microespátula, depositándolos en bolsas de papel filtro, de un tamaño de 5 cm x 5 cm, las cuales se cerraron con grapas (Figura 7).



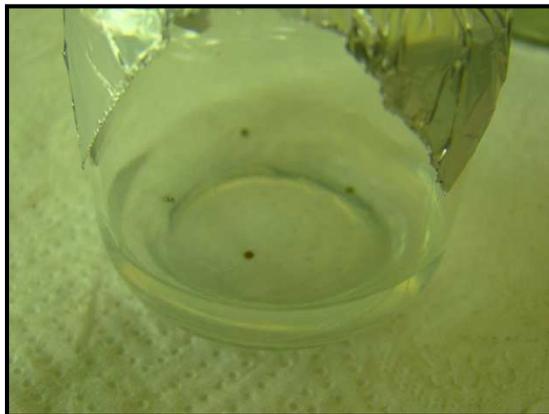
**Figura 7.** Extracción de soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.). a) Extracción de pinna. b) Bolsas de papel filtro.

Posteriormente, las bolsas de papel filtro se colocaron dentro de una bolsa de brin (tela gruesa de lino, usada para forros y pintar al óleo), con el propósito de recoger los soros que quedaran afuera del papel filtro ante una posible ruptura del mismo.

Los soros fueron desinfectados con una solución de alcohol etílico al 70% por 2 minutos, se retiró el exceso de alcohol por medio de un enjuague con agua destilada esterilizada y se sumergieron dentro de hipoclorito de sodio al 2% durante 4 minutos. Finalmente se retiró el exceso de hipoclorito de sodio sumergiendo en agua destilada estéril por 2 minutos y luego nuevamente en agua destilada estéril por 1 minuto más.

#### **D. Siembra de los soros en los recipientes**

Se colocaron los soros previamente desinfectados en los recipientes con el medio de cultivo, colocando cuatro soros por recipiente, la siembra se realizó en la campana de flujo laminar (figura 8).



**Figura 8. Soros colocados en medio de cultivo MS.**

#### **E. Incubación de los medios de cultivo**

Las unidades experimentales previamente identificadas con el número de tratamiento y repetición fueron trasladadas a un anaquel del cuarto de incubación y se distribuyeron sobre éste de acuerdo a lo indicado en las figuras 9 y 11. Éstos fueron colocados en condiciones de baja intensidad de luz y a una temperatura de 25°C.



**Figura 9. Ubicación de las unidades muestrales.**

### **F. Licuado de los prótalos**

Los helechos pueden ser regenerados de tejidos macerados. En este ensayo a los 90 días después de la siembra de los soros se realizó un licuado de los prótalos formados con agua esterilizada con el objetivo de que hubiera una mayor fecundación de los anteridios con los arquegonios y así aumentar las probabilidades de producción de esporofitos. Cabe señalar que el tiempo de licuado fue el mismo en todos los tratamientos, aproximadamente 2 segundos (Rosales, 2005).

Luego se dispersó el licuado obtenido en los frascos con los medios de cultivo, a razón de 2 mL en las cuatro concentraciones de medio MS ya mencionadas, con 10 repeticiones cada una. De igual manera se colocaron las unidades muestrales dentro del cuarto de incubación, hasta obtener los esporofitos jóvenes según correspondiera a cada tratamiento y repetición como se ilustra en la figura 9 (Rosales, 2005).

### **6.2.1.4 Diseño experimental**

#### **A. Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales**

El diseño experimental fue completamente al azar. Se seleccionó este diseño debido a que las condiciones de laboratorio son homogéneas. La unidad experimental consistió de un medio de cultivo conteniendo 4 soros en el mismo, y se repitió cada tratamiento 10 veces para un total de 40 unidades experimentales.

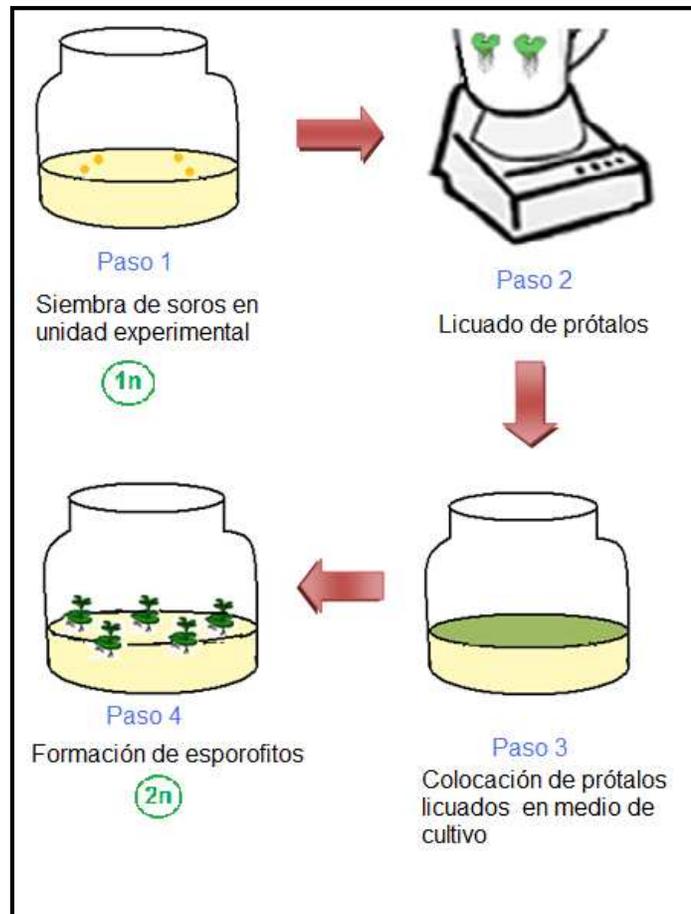


Figura 10. Secuencia para la obtención de esporofitos de calahuala.

## B. Tratamientos

Para la propagación de calahuala por medio de soros se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), a cuatro concentraciones distintas. Cada una de las concentraciones del medio se constituyó como un tratamiento.

**Tratamiento 1:** medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 100 por ciento.

**Tratamiento 2:** Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 75 por ciento.

**Tratamiento 3:** medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 50 por ciento.

**Tratamiento 4:** medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) con concentraciones de sales al 25 por ciento.

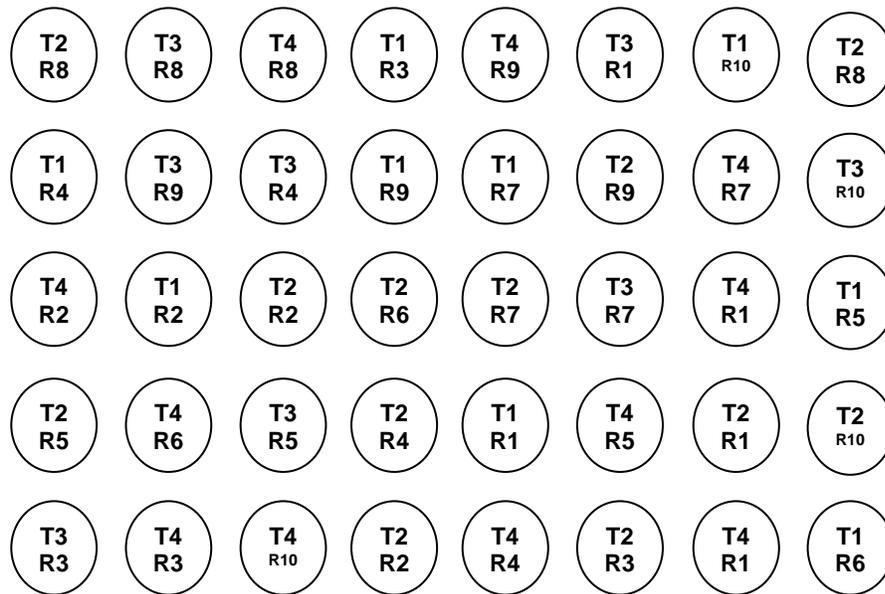


Figura 11. Distribución aleatoria de los tratamientos y unidades experimentales para la propagación de calahuala *in vitro*.

### C. Modelo estadístico

El modelo estadístico a utilizar fue el mismo tanto para determinar la concentración del medio MS que presenta el mayor porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros como para determinar la concentración que presenta el mayor porcentaje de esporofitos desarrollados.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

#### Variable porcentaje de germinación:

$Y_{ij}$  = Porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

$\mu$  = Media general del porcentaje de germinación esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

$T_i$  = Efecto del nivel de concentración del medio de cultivo MS sobre el porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la unidad experimental.

**Variable número de esporofitos:**

**Y<sub>ij</sub>** = Número de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**μ** = Media general del número de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**T<sub>i</sub>** = Efecto del nivel de concentración del medio de cultivo MS sobre el número de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**E<sub>ij</sub>** = Error experimental asociado a la unidad experimental.

**Variable altura promedio de esporofitos:**

**Y<sub>ij</sub>** = Altura promedio de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**μ** = Media general de la altura promedio de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**T<sub>i</sub>** = Efecto del nivel de concentración del medio de cultivo MS sobre la altura promedio de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**E<sub>ij</sub>** = Error experimental asociado a la unidad experimental.

**D. Variables de respuesta en los modelos**

Variable primaria: Porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

Variable secundaria: Número de esporofitos jóvenes de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

Variable terciaria: Altura promedio de esporofitos jóvenes de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**E. Toma y registro de datos**

En esta fase se evaluó el porcentaje de prótalos en el medio de cultivo MS a cuatro concentraciones diferentes, así como el número de esporofitos desarrollados en los tratamientos.

El porcentaje de prótalos se estimó mediante la observación de la densidad de cada una de las unidades experimentales. Se llevó a cabo el registro en el cuadro 3.

**Cuadro 3. Formato para el registro de la producción de prótalos y tiempo de germinación por unidad experimental.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																				
	R1		R2		R3		R4		R5		R6		R7		R8		R9		R10		
	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	
T1 (MS 100%)																					
T2 (MS 75%)																					
T3 (MS 50%)																					
T4 (MS 25%)																					

(Basado en Rosales, 2005. Página 33)

**Referencias:** PP = Porcentaje de producción de prótalos por unidad experimental.

TG = Tiempo de germinación promedio por unidad experimental (días).

Para la toma de datos de la producción de esporofitos, se realizó estimación por unidad experimental. Para ello, se dividió el área sembrada en cuatro partes y se contó el número de esporofitos en una de ellas, multiplicando luego por cuatro para estimar el número de esporofitos en el área total. El registro se llevó a cabo en el cuadro 4. Asimismo, se hicieron estimaciones de altura por unidad experimental, registrándolas en el mismo cuadro.

**Cuadro 4. Formato para el registro de esporofitos jóvenes y altura promedio por unidad experimental.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																				
	R1		R2		R3		R4		R5		R6		R7		R8		R9		R10		
	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	
T1 (MS 100%)																					
T2 (MS 75%)																					
T3 (MS 50%)																					
T4 (MS 25%)																					

(Basado en Rosales, 2005. Página 33)

**Referencias:** NE = Número esporofitos jóvenes por unidad experimental.

AP = Altura promedio de esporofitos jóvenes por unidad experimental (cm).

## **F. Análisis de la información**

Se realizó un análisis de varianza para el modelo de distribución completamente al azar con cuatro tratamientos y diez repeticiones. En cuanto a la germinación, se obtuvieron diferencias significativas en dicho análisis, por lo que se procedió a realizar la prueba múltiple de medias de Tukey con una significancia mínima del 5% a fin de establecer qué concentración de medio MS es la más apropiada para dicha variable. En cuanto a la formación de esporofitos, no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al número de esporofitos por unidad experimental, pero si se obtuvieron en cuanto a la altura de los mismos, por lo que se procedió a realizar la prueba múltiple medias de Tukey con una significancia del 5% a fin de establecer qué concentración de medio MS es la más apropiada para dicha variable.

### **6.2.2 Propagación de calahuala en condiciones semiestériles**

#### **6.2.2.1 Área experimental**

Esta fase de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis de Semillas de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. Las condiciones en las cuales se colocaron las esporas para su germinación simularon un microclima para el desarrollo de los esporofitos.

#### **6.2.2.2 Instrumentos, equipo, cristalería y reactivos**

Para la presente investigación se hizo uso de instrumentos, equipo, cristalería, reactivos e insumos que a continuación se describen.

#### **A. Instrumentos**

Mallas, espátula, recipientes para sustrato, lámparas de 20 watts.

#### **B. Equipo**

Balanza analítica.

#### **C. Otros**

Cycosin 50SC (Thiophanato y Metil), Bayfolan Forte (multimineral quelatado), saran wrap.

### 6.2.2.3 Manejo del experimento

#### A. Caracterización de sustratos a utilizar

Para tener certeza de algunas características físicas y químicas de interés como pH, porcentaje de materia orgánica, porcentaje de humedad, entre otros, de los sustratos que sirvieron como tratamiento, se llevaron muestras de cada uno de ellos al laboratorio de suelo-planta-agua “Salvador Castillo Orellana” de la Facultad de Agronomía. Los resultados pueden observarse en el Anexo 2.

#### B. Recolección de esporas

Las esporas se recolectaron cuando los soros en las frondas de la especie en estudio presentaron un cambio de coloración de verde a amarillo oro. Las frondas se cortaron y se depositaron sobre papel blanco de tal manera que en un período de 24-48 horas se desprendieran y se depositaran sobre el mismo (Figura 12). Luego se almacenaron en un tubo de ensayo, con la siguiente identificación: el origen de las esporas, fecha de recolección, especie, nombre del recolector y se almacenaron en un lugar seco, fresco y en ausencia de luz (Mendoza, Ruiz y Vargas, 2005).



**Figura 12.** Fronda de calahuala lista para colocarse sobre papel blanco con la coloración amarillo oro de sus soros.

#### C. Preparación de medios de siembra

Los sustratos que se utilizaron fueron peat moss, cascarilla de arroz y arena blanca, los cuales se prepararon de la siguiente manera:

La cantidad de sustrato que se utilizó fue de aproximadamente 432 cm<sup>3</sup> por bandeja de 20.5 cm x 14 cm x 3 cm, haciendo un total de 1,728 cm<sup>3</sup> de sustrato por tratamiento. La cantidad utilizada de cada sustrato de acuerdo a su peso fue:

Peat moss:	105 gramos.
Cascarilla de arroz mullida:	100 gramos.
Arena blanca:	280 gramos.

Se tamizaron con una malla número 16 con el propósito de eliminar el material grueso. Después se esterilizaron a 18 psi por 25 minutos. Luego se humedecieron y se les aplicó una solución fungicida preparada con 4.25 ml/Lt de Cycosin 50SC (Thiophanato y Metil) de la casa BASF (según especificaciones del fabricante), cuya finalidad fue la desinfestación del sustrato de todo hongo patógeno que pudiera causar alguna contaminación posterior.

Después de 24 horas de aplicado el Cycosin 50SC se aplicó una solución con 6.25 ml/Lt de Bayfolan Forte (Mendoza *et al.*, 2005).

Las soluciones de Cycosin y Bayfolan se aplicaron a manera de humedecer y desinfectar el sustrato previamente cernido, a razón de 30 ml de cada producto aproximadamente (Mendoza *et al.*, 2005).

El material preparado se colocó dentro de las bandejas con un espesor de sustrato de 2 cm (figuras 13 y 14).



**Figura 13.** Aspersión de fertilizante foliar a sustratos para humedecimiento.



**Figura 14. Colocación de sustrato dentro de las bandejas.**

#### **D. Siembra de esporas**

Las esporas previamente recolectadas se depositaron sobre el medio preparado en las bandejas, utilizando una espátula en un lugar ausente de corrientes de aire, debido a la facilidad con que son arrastradas fuera del recipiente de siembra (Mendoza *et al.*, 2005).

La siembra se hizo de tal manera que se pudiera llevar un control sobre el área en la cual ya se hubieran dispersado las esporas, debido a que algunas veces resulta muy difícil detectar el lugar donde son sembradas a simple vista. La siembra se hizo uniforme para aprovechar al máximo el material de siembra y el tiempo de germinación (Mendoza *et al.*, 2005).

Se cuantificaron aproximadamente 230,000 esporas sembradas por bandeja. Esta cuantificación se realizó mediante estimación: se tomó un miligramo de esporas y se colocó sobre una placa de conteo, en la que se estimó el número total de esporas, el cual ascendió aproximadamente a 36,000 esporas. Luego se pesó el total de esporas recolectadas que fue de 76.88 miligramos. Esta cantidad fue dividida en 12 partes, lo que resultó en 6.40 miligramos/unidad experimental, equivalente a 230,000 esporas/unidad experimental. La cantidad de esporas en miligramos utilizada inicialmente correspondió al 100%.

### E. Germinación de esporas

Las esporas sembradas en los tratamientos colocados en las bandejas se protegieron cubriéndolas con plástico de envoltura conocido como saran wrap y sellando de tal manera que se minimizara la pérdida de humedad del material de siembra durante la germinación (Mendoza *et al.*, 2005).

La bandeja con el material de siembra y esporas debidamente selladas se colocó a una distancia de 30 cm de una lámpara de 30 watts, que iluminó completamente la superficie sembrada a través de la cubierta de plástico como se muestra en la figura 15 (Mendoza *et al.*, 2005).

En esta fase se determinó el sustrato que proporcionara las mejores condiciones para la germinación de esporas.



Figura 15. Colocación de tratamientos bajo fuente de luz.

### E. Trasplante de esporas germinadas

Las esporas germinadas fueron separadas en pequeños grupos y colocadas en bandejas con material de siembra preparado de igual forma que el sustrato utilizado para la germinación de esporas y se asperjaron con una solución de Bayfolan en concentración de 6.25 ml/L. Esta actividad se realizó cada dos semanas alternando con aspersión de fungicida Cycosin 50SC en concentración de 4.25 ml/L, dentro de un microclima elaborado con plástico transparente, bajo sombreador de sarán como se muestra en la figura 16 (Mendoza *et al.*, 2005).



**Figura 16.** Ubicación de las unidades muestrales conteniendo los prótalos ya trasplantados.

En esta fase se buscó determinar el tratamiento que mejor respuesta presentara al desarrollo de los esporofitos de calahuala.

#### **6.2.2.4 Diseño experimental (Segundo ensayo)**

##### **A. Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales**

El diseño experimental fue completamente al azar. La fase de determinación del porcentaje de germinación de esporas se realizó con tres tratamientos y cuatro repeticiones para un total de 12 unidades experimentales. La fase de determinación del número de esporofitos se analizó con dos tratamientos y cuatro repeticiones para un total de 8 unidades experimentales, debido a que el tratamiento de arena utilizado en la fase anterior no presentó crecimiento de esporofitos.

Cada unidad experimental constó de 1 bandeja germinadora con su correspondiente sustrato ya sea con las esporas o las rosetas de prótalos.

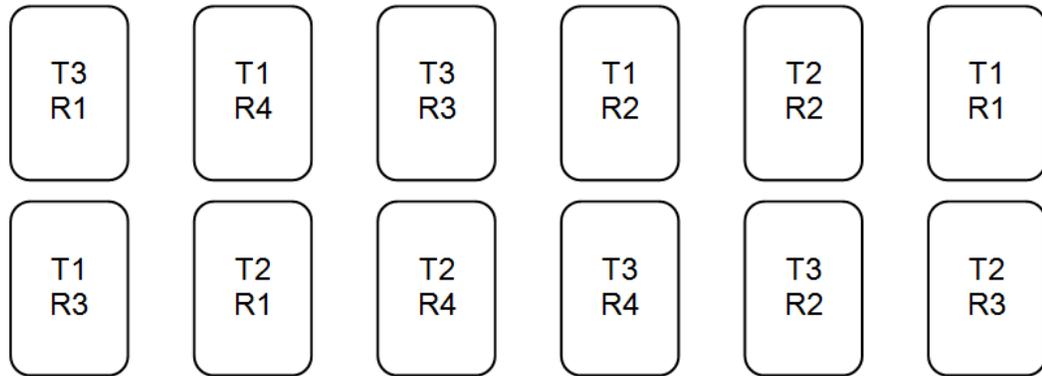
##### **B. Tratamientos**

Se emplearon 3 sustratos diferentes, y cada uno de los sustratos se constituyó como un tratamiento.

**Tratamiento 1:** Peat most.

**Tratamiento 2:** Cascarilla de arroz mullida.

**Tratamiento 3:** Arena blanca.



**Figura 17. Distribución de las unidades experimentales para la propagación de calahuala en condiciones semiestériles.**

### **C. Modelo estadístico**

El modelo estadístico utilizado para determinar el sustrato que proporcionara las mejores condiciones para la germinación de esporas de calahuala en condiciones semiestériles, así como para determinar el que proporcionara las mejores condiciones para el desarrollo de esporofitos.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

#### **Variable porcentaje de germinación de esporas:**

**$Y_{ij}$**  = Porcentaje de germinación de esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**$\mu$**  = Media general del porcentaje de germinación de esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**$T_i$**  = Efecto del sustrato utilizado sobre el porcentaje de germinación de esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

**$E_{ij}$**  = Error experimental asociado a la unidad experimental.

#### **Variable número de esporofitos desarrollados:**

**$Y_{ij}$**  = Número de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

$\mu$  = Media general del porcentaje de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

$T_i$  = Efecto del sustrato utilizado sobre el porcentaje de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la unidad experimental.

#### D. Variables de respuesta del modelo

Variable primaria: Porcentaje de germinación de esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

Variable secundaria: Número de esporofitos desarrollados de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.).

#### E. Toma y registro de datos

En esta fase se evaluó el porcentaje de germinación de esporas en los sustratos correspondientes. Se llevó a cabo el registro en el cuadro 5.

No se llevó a cabo el conteo de número de esporofitos desarrollados ni la estimación de alturas de los mismos, debido a que la respuesta en los tratamientos establecidos fue nula.

**Cuadro 5. Formato para el registro de esporas germinadas como prótalos y tiempo por unidad experimental.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES							
	R1		R2		R3		R4	
	PE	TG	PE	TG	PE	TG	PE	TG
T1 (Peat moss)								
T2 (Cascarilla de arroz mullida)								
T3 (Arena blanca)								

(Basado en Rosales, 2005. Página 33)

**Referencias:** PE = Porcentaje de esporas germinadas como prótalos por unidad experimental.  
TG = Tiempo de germinación promedio como prótalos por unidad experimental (días).

## **F. Análisis de la información**

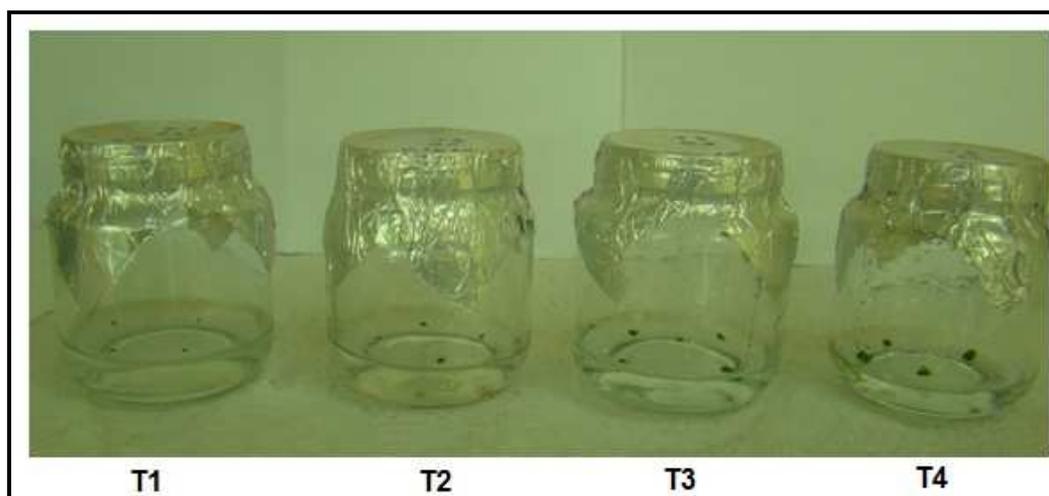
En cuanto a la germinación, se realizó un análisis de varianza para el modelo de distribución completamente al azar con tres tratamientos y cuatro repeticiones. Se obtuvieron diferencias significativas en dicho análisis, por lo que se procedió a realizar la prueba múltiple de Tukey con una significancia del 5% a fin de establecer el sustrato más apropiado para dicha variable. En cuanto a la formación de esporofitos, no se obtuvieron resultados en ninguno de los dos tratamientos, por lo que no se presentan datos que registrar ni analizar estadísticamente.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Propagación de calahuala *in vitro*

La germinación de las esporas contenidas en los soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) en medio de cultivo MS, se realizó aproximadamente a los 30 días en el tratamiento 4. Para el tratamiento 3, el tiempo de germinación promedio fue de 32 días. Los soros ubicados dentro de los tratamientos 1 y 2, germinaron en promedio a los 34 y 35 días respectivamente. Dichos datos están contenidos en el rango normal del proceso germinativo de esporas de calahuala.

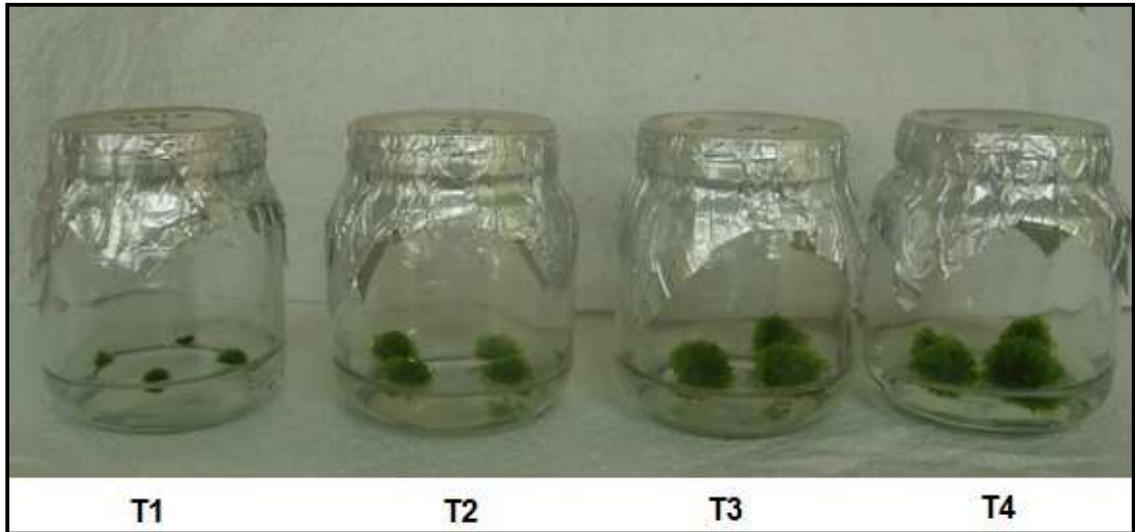
La germinación de esporas se caracterizó por la formación de una masa de color verde oscuro que dio inicio a la formación de prótalos como se observa en la figura 18, en donde se muestra una unidad experimental representativa de cada uno de los tratamientos (medio de cultivo MS al 100%, 75%, 50% y 25%). Se puede apreciar que los tratamientos 3 y 4 son los que presentan la mayor masa de prótalos a los 40 días, en comparación con los tratamientos 1 y 2.



**Figura 18.** Germinación de esporas contenidas en soros de calahuala a los 40 días después de la germinación.

A los 90 días después de la siembra de soros, se realizó el procedimiento del licuado de los prótalos, los cuales se observan en la figura 19. En esta figura se repite el fenómeno de la figura 18, en donde los tratamientos 3 y 4 son los que presentan la masa de prótalos más grande. Por tal razón, se esperó que al realizar el licuado de los mismos, hubiera mayor

posibilidad de unión de anteridios con los arquegonios, y por lo tanto, mayor cantidad de esporofitos jóvenes de acuerdo a la cantidad de masa de prótalos formada.



**Figura 19.** Masa de prótalos a los 90 días después de la siembra de esporas contenidas en soros de calahuala, previo al licuado de los mismos.

A los 160 días (aproximadamente 5 meses) se procedió al conteo de esporofitos y a la medición de las alturas de los mismos, los cuales se empezaron a formar aproximadamente a los 32 días después del licuado (figura 20). La duración total del ensayo para la obtención de esporofitos jóvenes de calahuala a través de esporas contenidas en soros fue de 250 días, lo que equivale aproximadamente a 8 meses.



**Figura 20.** Formación de esporofitos de calahuala a los 30 días después del licuado de prótalos.

La altura de los esporofitos formados al momento de la medición, se puede observar en la figura 21, en donde a simple vista, los tratamientos 1 y 2 son los que presentan mayor altura, esto debido probablemente a que existe una mayor concentración de sales (al 75% y 100%) dentro del medio.

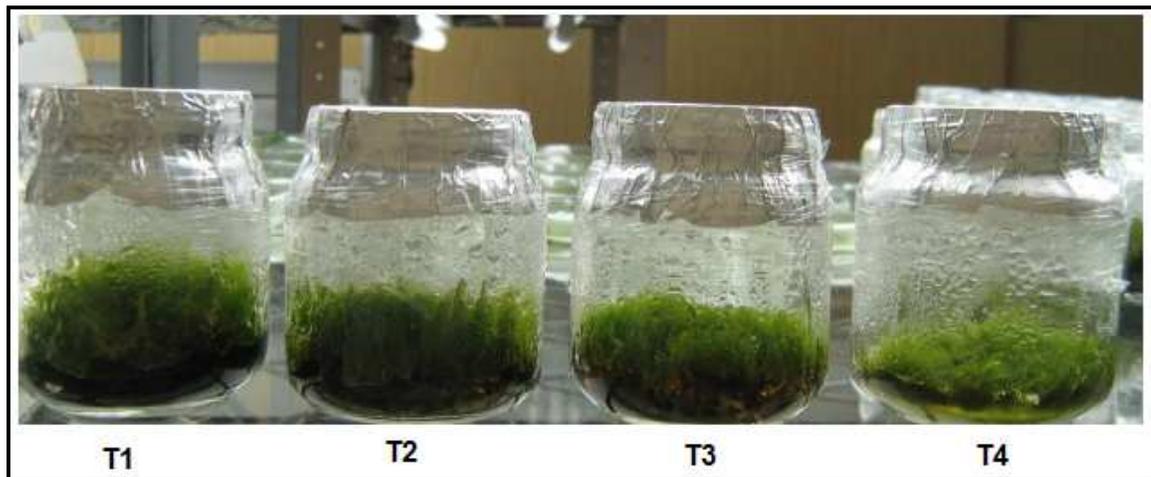


Figura 21. Formación de esporofitos de Calahuala a los 160 días después del licuado de prótalos.

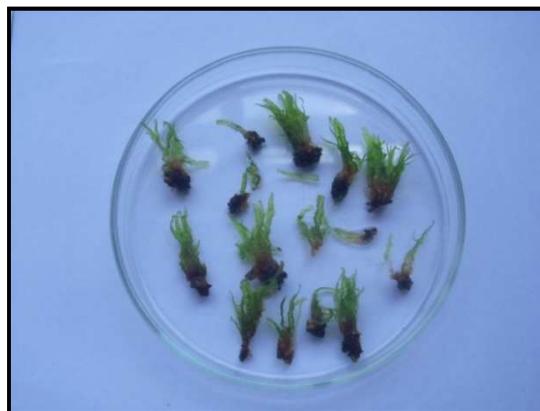


Figura 22. Conteo de esporofitos de Calahuala a los 160 días después del licuado de prótalos.

### 7.1.1 Porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros

En el Cuadro 6 se presenta el resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros, así como otras variables. Además el porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros por tratamiento se observa en el Anexo 3.

**Cuadro 6. Resumen del análisis de varianza para las variables de la propagación de calahuala *in vitro*, Facultad de Agronomía, USAC, 2009.**

<b>PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE ESPORAS CONTENIDAS EN SOROS</b>					
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	9221.68	3	3073.89	25.25	<0.0001**
Columna1	9221.68	3	3073.89	25.25	<0.0001**
Error	4382.10	36	121.73		
Total	13603.78	39			
<b>NÚMERO DE ESPOROFITOS JÓVENES</b>					
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	195950.90	3	65316.97	0.96	0.4236 NS
Tratamiento	195950.90	3	65316.97	0.96	0.4236 NS
Error	2457387.00	36	68260.75		
Total	2653337.90	39			
<b>ALTURA PROMEDIO DE ESPOROFITOS JÓVENES</b>					
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo	1.01	3	0.34	25.71	<0.0001**
Tratamiento	1.01	3	0.34	25.71	<0.0001**
Error	0.47	36	0.01		
Total	1.48	39			

\* = Significativo

\*\* = Altamente significativo

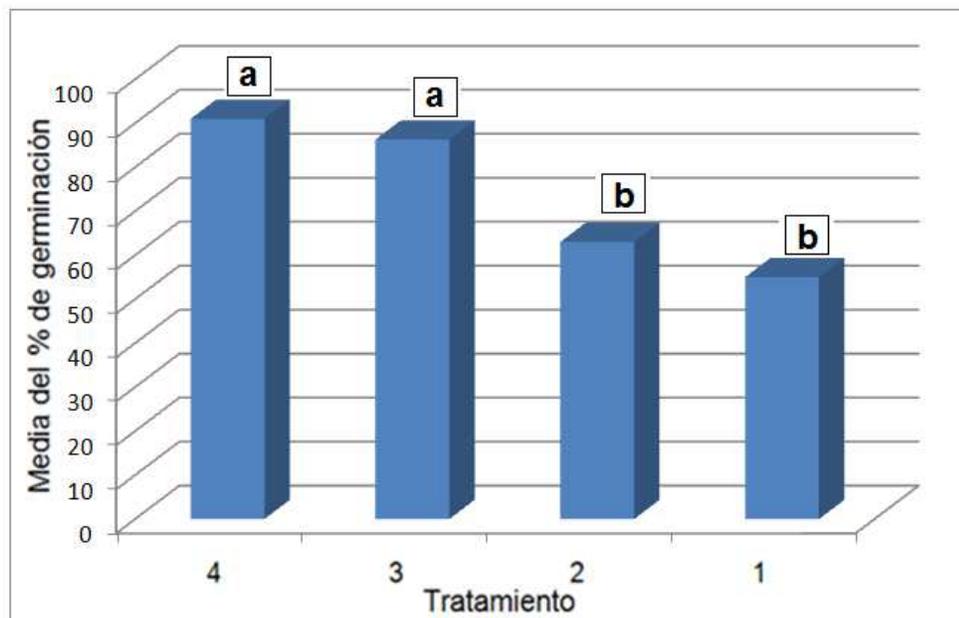
NS = No significativo

En el cuadro 6, para la variable porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros, se indica que con un umbral de significancia menor a 0.0001 entre tratamientos (el cual supera al 5% planteado inicialmente), al menos un tratamiento presenta un porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros diferente al de los demás. Para establecer cuál o cuáles tratamientos presentaron el mayor porcentaje de germinación por unidad experimental de acuerdo a la significancia obtenida, se procedió a realizar la Prueba Múltiple de Medias de Tukey al 5% de significancia, la cual se muestra en el cuadro 7. En la figura 23 se observa la gráfica de dicha prueba para el porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros.

**Cuadro 7. Prueba Múltiple de Medias de Tukey con una significancia al 5% para las variables de la propagación de calahuala *in vitro*.**

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE ESPORAS CONTENIDAS EN SOROS				
Tratamiento	Medias	n		
4	91.00	10	a	b
3	86.30	10		
2	63.00	10		
1	55.00	10		
ALTURA PROMEDIO DE ESPOROFITOS JÓVENES				
Tratamiento	Medias	n		
2	1.28	10	a	b
3	1.03	10		
4	0.89	10		
1	0.89	10		

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 23. Grafica de la prueba múltiple de medias de Tukey para la variable porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros.**

Estadísticamente y con una confianza del 95%, se puede decir que en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) al 25% y al 50% de concentración (tratamientos 4 y 3), se obtuvo el mayor porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros de calahuala, con medias 91% y 86.3% respectivamente. Al emplear el mismo medio de cultivo, pero a concentraciones de 75% y 100% (tratamientos 2 y 1), se obtuvieron bajos porcentajes de

germinación de esporas contenidas en soros de calahuala, con medias 63% y 55% respectivamente.

Al aumentar la concentración de sales en el medio de cultivo MS por arriba del 50%, el porcentaje de germinación de esporofitos contenidos en soros disminuye.

### **7.1.2 Número de esporofitos jóvenes**

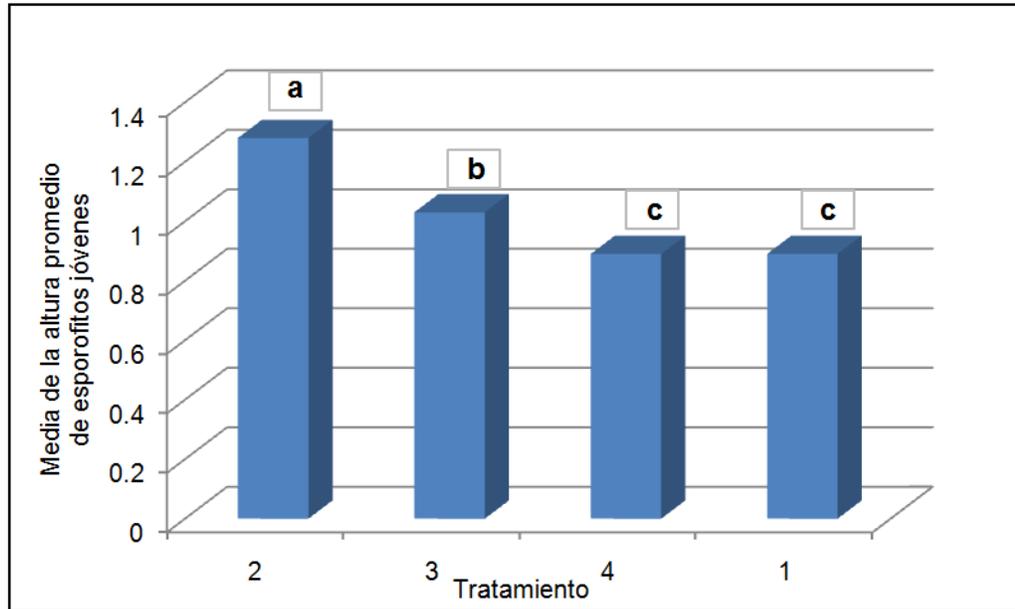
En el cuadro 6 se presenta el resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta número de esporofitos jóvenes. Se observa que con un nivel de significancia de 0.4236 (el cual es mayor al 5% planteado inicialmente), por lo que no existe diferencia significativa entre los tratamientos en cuanto al número de esporofitos jóvenes. En este caso, se puede decir que el número de esporofitos jóvenes no varía significativamente entre una y otra concentración de medio MS.

Además la cantidad de esporofitos que se cuantificaron por tratamiento se presenta en el Anexo 3.

### **7.1.3 Altura promedio de esporofitos jóvenes**

Se realizó un análisis de varianza para la variable altura promedio de esporofitos jóvenes, la cual se presenta en el cuadro 6, en donde se indica que con un umbral de significancia menor a 0.0001 entre tratamientos (el cual supera al 5% planteado inicialmente), al menos un tratamiento presenta una mayor altura de esporofitos jóvenes que los demás. Para establecer cuál o cuáles tratamientos presentaron la mayor altura de esporofitos jóvenes por unidad experimental de acuerdo a la significancia obtenida, se procedió a realizar la Prueba Múltiple de Medias de Tukey al 5% de significancia, la cual se muestra en el cuadro 7. En la figura 24 se observa la gráfica de dicha prueba para la altura promedio de esporofitos jóvenes.

La altura promedio de esporofitos jóvenes por tratamiento se observa en el Anexo 3.



**Figura 24.** Grafica de la prueba múltiple de Tukey para la variable altura promedio de esporofitos jóvenes.

Estadísticamente y con una confianza del 95%, se indica que en el medio de cultivo Murashige y Skoog (1,962) al 75% de concentración (tratamiento 2), se obtuvo la mayor altura promedio de esporofitos jóvenes de calahuala, con media de 1.28 cm por unidad experimental. La concentración al 50% del mismo medio (tratamiento 3), ocupa el segundo lugar en cuanto a altura promedio de esporofitos jóvenes, con una media de 1.03 cm por unidad experimental. Los valores más bajos se obtuvieron en concentraciones al 25% y 100% del mismo medio de cultivo (tratamientos 4 y 1 respectivamente) ambos con media 0.89 cm. Al aumentar la concentración de sales en el medio de cultivo MS por arriba del 75%, la altura promedio de esporofitos jóvenes disminuye y al reducir la concentración del medio de cultivo por debajo del 50% también la altura promedio de esporofitos jóvenes disminuye.

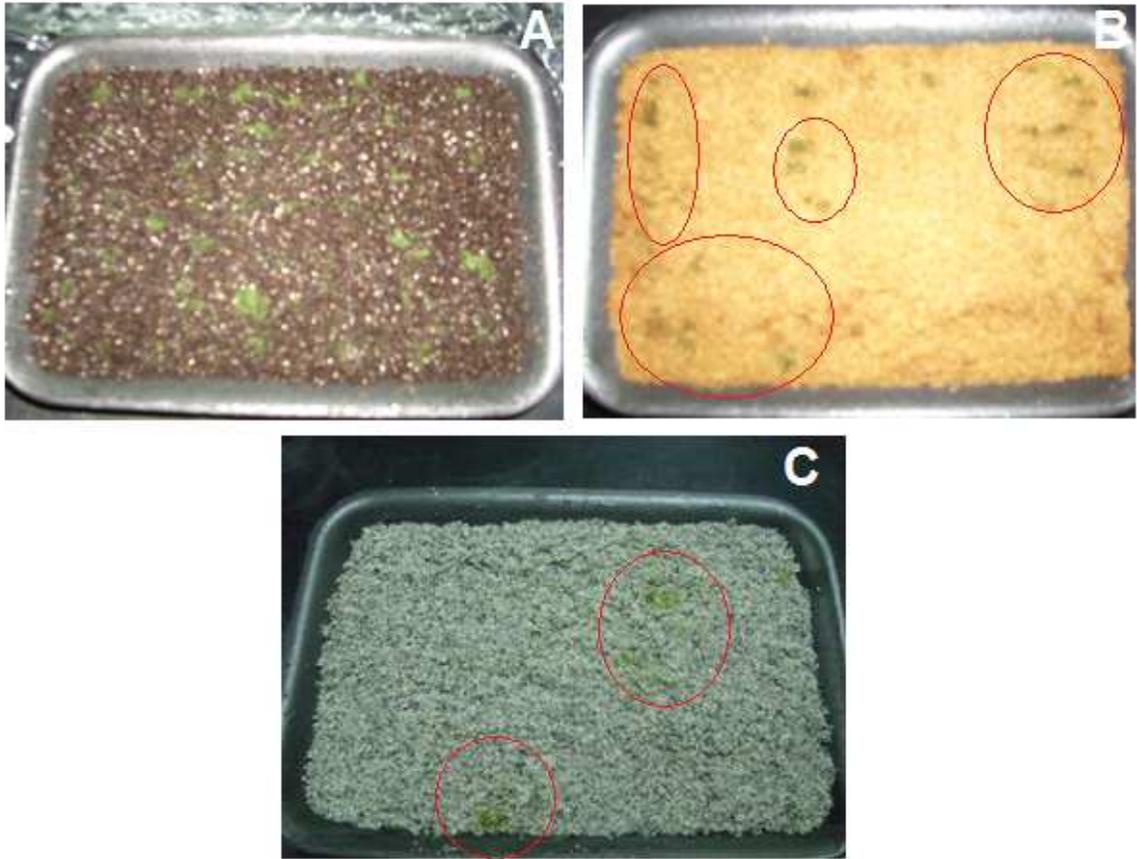
## 7.2 Propagación de calahuala en condiciones semiestériles

La germinación de las esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) en condiciones semiestériles, se realizó aproximadamente a los 20 días en el tratamiento 1, a los 27 días en el tratamiento 2 y a los 51 días en el tratamiento 3, esto debido probablemente a que la calahuala prefiere sustratos relativamente ácidos (pH 5.7), condición que presenta el peat moss (tratamiento 1) y la cascarilla de arroz (tratamiento 2), pero no así la arena (tratamiento 3).

La germinación se caracterizó por la formación de una diminuta alfombra de color verde, lo que indicaba que las esporas habían iniciado la germinación. En la figura 25 se muestra una unidad experimental de cada uno de los tres tratamientos evaluados (peat moss, cascarilla de arroz y arena blanca). Se puede apreciar que el tratamiento 1 (peat moss) y el tratamiento 2 (cascarilla de arroz), presentaron una germinación más rápida que el tratamiento 3 (arena blanca).

En el Anexo 2 se muestra el análisis de laboratorio realizado para cada uno de los tres sustratos. Se observa que el peat moss (tratamiento 1) presenta un pH de 5.6, la cascarilla de arroz (tratamiento 2), un pH de 6.3 y la arena blanca (tratamiento 3), un pH de 9.0. El pH del peat moss (tratamiento 1) muestra un sustrato relativamente ácido (5.6), ocasionado por los altos niveles de materia orgánica presentes (61.32%), lo cual coincide con la información recopilada en el marco teórico, que indica que el sustrato natural de la calahuala es rico en materia orgánica, por lo que las condiciones de pH son relativamente ácidas.

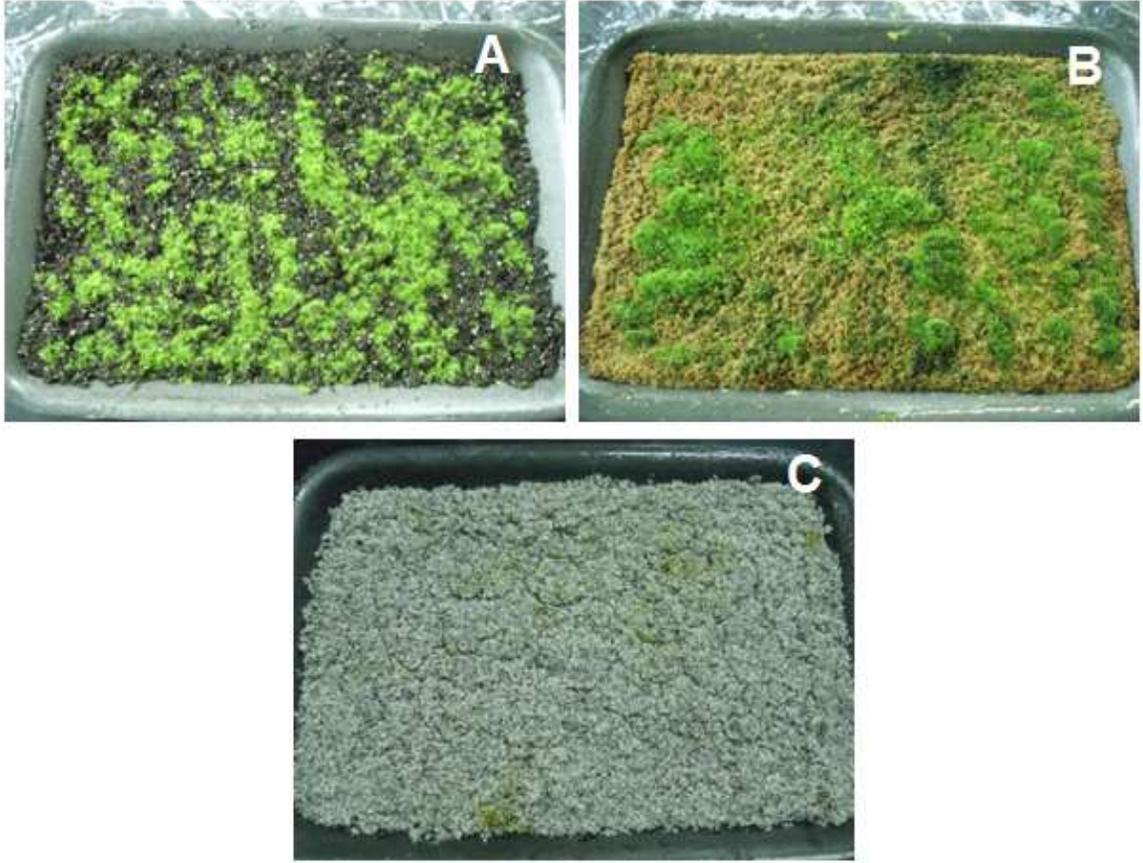
Esta alfombra verde no constituía aún los prótalos de calahuala. A los 55 días después de la siembra, casi 9 semanas después, se procedió a realizar la estimación por unidad experimental en los tratamientos 1 y 2, debido a que ya habían formado prótalos, mientras que el tratamiento 3, empezaba a germinar sus esporas. En la figura 26 se muestran los tratamientos 1 y 2 a los 55 días después de la siembra en comparación con el tratamiento 3.



**Figura 25.** Germinación de esporas de Calahuala. a) En peat moss a los 20 días después de la siembra. b) En cascarilla de arroz mullida a los 27 días después de la siembra. c) En arena blanca a los 51 días después.

En la figura 26 se observan pequeñas áreas de color verde más intenso en el tratamiento 2, debido a que los prótalos ya formados, empezaban a degradarse y a morir sobre el mismo. Una explicación a este fenómeno, se indica al tomar en cuenta que la cascarilla de arroz, al encontrarse en contacto con el agua por mucho tiempo, se puede fermentar, lo que posiblemente ocasionó la muerte de los prótalos ya formados, debido a cambios de temperatura y acidez.

Para ello se determinó el número de prótalos en un centímetro cuadrado de cada uno de los sustratos con prótalos (peat moss y cascarilla de arroz) y luego, mediante una rejilla de puntos, se determinó el área germinada a nivel de prótalos de los tratamientos 1 y 2, realizando el cálculo para conocer el número aproximado (figura 27).



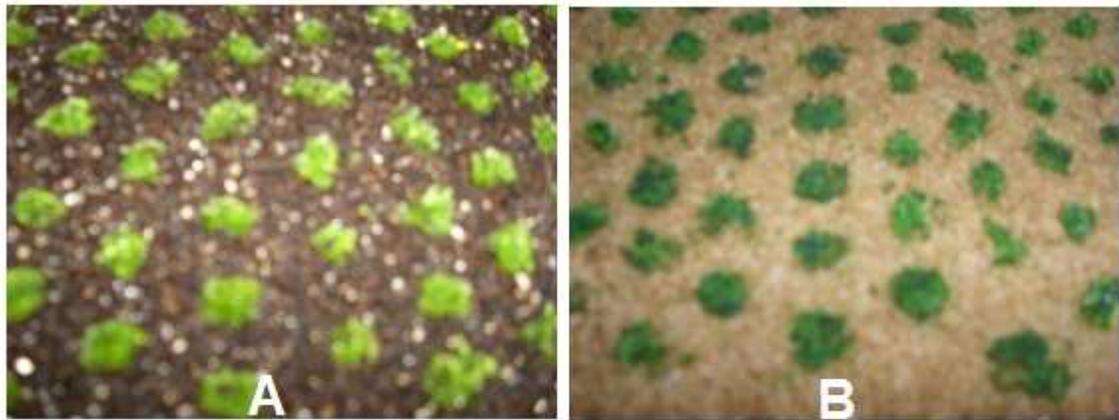
**Figura 26.** Diferencia en cuanto a formación de prótalos de Calahuala entre tratamientos a los 55 días de siembra. a) En peat moss. b) En cascarilla de arroz mullida. c) En arena blanca.



**Figura 27.** Estimación de áreas de los tratamientos 1 y 2, por medio de una rejilla de puntos, para determinar número aproximado de prótalos.

Después de realizar la estimación, se procedió a realizar el trasplante mencionado en la metodología. Para lo cual se obtuvieron rosetas de prótalos de aproximadamente 1 centímetro cuadrado y éstas fueron trasladadas a otras bandejas con sustrato preparado de igual manera que para la siembra (figura 28).

Es importante señalar que el trasplante se hace con el único propósito de proporcionar espacio a los prótalos en desarrollo, ya que éstos deben madurar para poder producir esporofitos, y al hacerlo su tamaño aumenta, por lo que al estar saturada el área, muchos pueden deteriorarse por falta de espacio, esto con la ventaja de brindarles un mejor desarrollo, pero con la desventaja de invertir tiempo y dinero en la preparación de un segundo sustrato.



**Figura 28. Rosetas de prótalos trasplantadas a nuevos sustratos. a) Peat moss. b) Cascarilla de arroz mullida.**

Debido a que la arena blanca posee un pH de 9.0, y por consiguiente, su nivel de materia orgánica baja (0.07%) la formación de prótalos sobre ésta es nula, ya que como menciona Martínez *et.al.* (2001), el pH del sustrato natural de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger según análisis químico realizado al mismo, es de 5.7, un sustrato relativamente ácido, y con altos niveles de materia orgánica (61.94%).

### **7.2.1 Porcentaje de germinación de esporas a nivel de prótalo en condiciones semiestériles**

En el cuadro 8 se presenta el resumen del análisis de varianza para la variable de respuesta porcentaje de germinación de esporas en condiciones semiestériles. El porcentaje de germinación de esporas a nivel de prótalo por tratamiento se observa en el Anexo 3.

**Cuadro 8. Resumen del análisis de varianza para el porcentaje de germinación de esporas en condiciones semiestériles.**

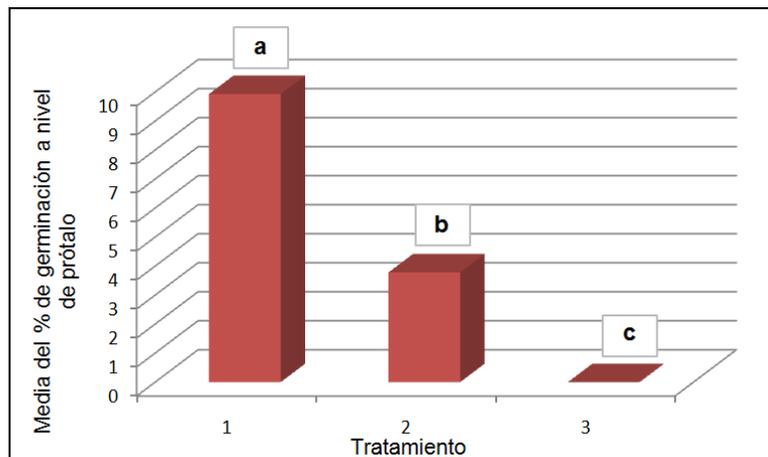
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	157.40	2	78.70	48.48	<0.0001
Tratamiento	157.40	2	78.70	48.48	<0.0001
Error	14.61	9	1.62		
Total	172.01	11			

Del cuadro 8, se puede concluir que con un umbral de significancia menor a 0.0001 entre tratamientos (el cual supera al 5% planteado inicialmente), que al menos un tratamiento presenta un porcentaje de germinación de esporas diferente a los demás. Para establecer cuál o cuáles tratamientos presentaron el mayor porcentaje de germinación por unidad experimental se procedió a realizar la prueba múltiple de medias de Tukey al 5% de significancia, la cual se muestra en el cuadro 9. En la figura 29 se observa la gráfica de dicha prueba para el porcentaje de germinación de esporas contenidas en soros.

**Cuadro 9. Prueba Múltiple de Medias de Tukey con una significancia al 5% para el porcentaje de germinación de esporas de calahuala a nivel de prótalo en sustrato.**

Tratamiento	Medias	n			
A	9.93	4	a	b	c
B	3.78	4			
C	0.00	4			

*Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )*



**Figura 29. Barras por tratamiento de la prueba múltiple de Tukey para la variable porcentaje de germinación de esporas de calahuala a nivel de prótalo en sustrato.**

En función de los sustratos, estadísticamente y con una confianza del 95%, se puede decir que el peat moss (tratamiento 1), obtuvo el mayor porcentaje de germinación de esporas a nivel de prótalos con una media de 9.93% por unidad experimental. La cascarilla de arroz mullida (tratamiento 2), ocupa el segundo lugar en cuanto a porcentaje de germinación de esporas a nivel de prótalos, con una media de 3.78% por unidad experimental.

El peat moss presenta las mejores condiciones para la germinación de esporas de calahuala a nivel de prótalo, por tener las condiciones más parecidas al sustrato natural de la calahuala. A la vez mantiene los prótalos en condiciones adecuadas, sin deteriorarlos, lo que permite un trasplante de rosetas exitoso con material vigoroso.

### 7.2.2 Número de esporofitos jóvenes en condiciones semiestériles

Luego del trasplante de las rosetas de prótalos a nuevas bandejas, poco a poco los prótalos colocados en cascarilla de arroz mullida se deterioraron, debido a que muchas rosetas ya tenían prótalos dañados (figura 30) al momento del trasplante, y sumado a ello, el sustrato no retenía mucha humedad, por lo que se tuvo que asperjar agua con mayor frecuencia, lo que provocó que los prótalos sobrevivientes acumularan gotas sobre sus tejidos, los cuales murieron. En este caso, el tratamiento con cascarilla de arroz, queda descartado como un posible sustrato para la formación de esporofitos.



**Figura 30. Rosetas de prótalos deterioradas sobre cascarilla de arroz mullida.**

Después de 144 días de haber realizado el trasplante (20 semanas aproximadamente), no hubo formación de esporofitos en los prótalos ubicados en el tratamiento que contenía el peat moss. Según experiencias consultadas con el helecho *Phyllitis scolopendrium* (L.) Newman, la formación de esporofitos a partir de la siembra de esporas en el sustrato se da aproximadamente a los 7 meses (210 días) (Jardín Botánico Mundani, 2008), y en el presente ensayo han pasado aproximadamente 295 días, sin ningún indicio de formación de esporofitos. El tiempo no podría ser el mismo, ya que se trata de diferentes especies, pero es la única referencia que se tiene en cuanto a la utilización del procedimiento desarrollado en la presente investigación, por lo que se podría decir que la formación de esporofitos se atrofió en algún momento del ciclo. La única explicación de este fenómeno, es que posiblemente las dosis de los productos que se aplicaron pudieran haber inhibido la fecundación de los arquegonios con los anteridios sobre el peat moss.

En el caso de la dosis del multimineral quelatado (6.25 ml/litro), aplicada cada dos semanas, fue tomada del documento desarrollado por Mendoza, Ruiz y Vargas, pero cabe hacer la aclaración que el sustrato que aquí se sugiere lleva por nombre comercial Sun Grow mix 2 Basic, del fabricante Sun Grow Agriculture, por lo que las condiciones de establecimiento desde un inicio fueron diferentes al sustrato mencionado, ya que éste es una mezcla de varios. Esta diferencia pudo repercutir en las aplicaciones del fertilizante foliar, ya que los nutrientes y la cantidad de los mismos varían dependiendo del tipo de sustrato utilizado, por lo que la dosis de fertilizante foliar sugeridas, podrían ser específicas para el tipo de sustrato mencionado en el documento, pudiendo ésta inhibir la fecundación de los anteridios con los arquegonios, o bien, la etapa subsiguiente a esta fecundación (Mendoza, 2003).

Por otro lado, la dosis utilizada del fungicida Cycosin 50SC (Thiophanato y Metil), se obtuvo del panfleto que viene adjunto a dicho producto. Para este caso, no existe una dosis específica para helechos, por lo que se tomó la dosis recomendada para plantas ornamentales, que fue la clasificación que más se acercó a la planta en cuestión. Posiblemente la dosis pudo ser demasiado alta o demasiado baja, por lo que los prótalos de calahuala pudieron experimentar alguna sensibilidad a esta dosis y afectó de manera directa la fecundación.

Asimismo, la combinación de estos dos productos en las dosis mencionadas, pudieron causar efectos negativos para la formación de esporofitos, en los tratamientos establecidos.

## 8. CONCLUSIONES

- 8.1 En la propagación *in vitro* de esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.), utilizando medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), se obtiene un mayor porcentaje de germinación (91%) en el medio de cultivo con concentración de sales al 25%. Asimismo, este tratamiento presenta el tiempo de germinación más corto (en promedio 30 días).
- 8.2 No existe diferencia significativa entre las concentraciones de sales utilizadas de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) en cuanto al número de esporofitos de (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) por unidad experimental, pero si en cuanto a la altura de los mismos, siendo el medio de cultivo al 75% el ideal, con una media de 1.28 cm.
- 8.4 En la propagación en condiciones semiestériles utilizando esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.), se obtiene un mayor porcentaje de germinación (9.93%) en el tratamiento que contiene peat moss. De igual manera, presenta el tiempo de germinación más corto (en promedio 20 días).
- 8.5 No se obtuvo respuesta en cuanto a la formación de esporofitos de (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) en ninguno de los sustratos establecidos, sin llegar a determinar la causa de dicho fenómeno.

## 9. RECOMENDACIONES

- 9.1 Para la propagación *in vitro* de esporas contenidas en soros de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.), utilizando medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), se recomienda realizar un subcultivo de esporofitos jóvenes a partir de los 150 días después de realizado el licuado de prótalos. Esto con el fin, de proporcionar menor competencia por espacio, luz y nutrientes a los esporofitos formados y permitir un mejor desarrollo de los pequeños frondes, y lograr así, la disminución del tiempo que puedan permanecer en el medio de cultivo antes de aclimatarlos.
- 9.2 Realizar evaluaciones de dosis y frecuencias de aplicación de fertilizante foliar Bayfolan Forte y del fungicida Cycosin 50SC (Thiophanato y Metil), durante la segunda fase de la propagación en condiciones semiestériles utilizando esporas de calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.), utilizando específicamente peat moss, ya que fue el tratamiento con mejores resultados a la germinación de esporas.
- 9.3 Para la propagación de *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. en condiciones semiestériles, es conveniente utilizar sustratos que proporcionen un pH ácido, ya que simula las condiciones naturales en que se desarrolla esta especie.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- 10.1 ANASAC (Agrícola Nacional, CL). s.f. Usos de la arena como sustrato [en línea]. Chile. Consultado 6 mar 2008. Disponible en: [http://www.anasac.cl/saveasdialog.asp?cod\\_cont=1850&bogus=Usos\\_Arena.pdf](http://www.anasac.cl/saveasdialog.asp?cod_cont=1850&bogus=Usos_Arena.pdf)
- 10.2 Andrade Castañeda, JC. 2003. Búsqueda de sustratos opcionales para la producción bajo cultivo de calahuala (*Phlebodium aureum* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 56 p.
- 10.3 Calderón, F. 2002. La cascarilla de arroz “caolinizada”: una alternativa para mejorar la retención de humedad como sustrato para cultivos hidropónicos [en línea]. Bogotá, Colombia, Asistencia Técnica Agrícola. Consultado 9 mar 2008. Disponible en: [http://www.drcalderonlabs.com/Investigaciones/Cascarilla\\_Caolinizada/La\\_Cascarilla\\_Caolinizada.htm](http://www.drcalderonlabs.com/Investigaciones/Cascarilla_Caolinizada/La_Cascarilla_Caolinizada.htm)
- 10.4 CONAP (Consejo Nacional de Áreas Protegidas, GT). 2009. Lista de especies amenazadas de Guatemala –LEA-. 2 ed. Guatemala. 120 p. (Documento Técnico no. 67 (02/2009)).
- 10.5 Cruz Sic, MM. 2004. Efecto de la 6-bencilaminopurina en la proliferación de brotes *in vitro* de tres variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, Guatemala, USAC. 102 p.
- 10.6 EXPROVA, GT. 2006. Semillas [en línea]. Guatemala. Consultado 9 jun 2008. Disponible en <http://www.exprova.com.gt/documentos/semillas.html>
- 10.7 IES (Instituto de Educación Secundaria “Torre del Águila”, ES). 2004. La era mesozoica: Filicinophytas (helechos) [en línea]. Sevilla, España. Consultado 1 jul 2008. Disponible en [http://www.juntadeandalucia.es/averroes/ies\\_torre\\_del\\_aguila/DINO/filicinofitas.htm](http://www.juntadeandalucia.es/averroes/ies_torre_del_aguila/DINO/filicinofitas.htm)
- 10.8 Izquierdo, H; Quiones, Y. 2001. Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas (en línea). Revista TEMAS (México) septiembre–diciembre 2001:39-55. Consultado 10 mar 2008. Disponible en <http://www.utm.mx/~temas/temas-docs/nfnotas15R2.pdf>
- 10.9 Jardín Botánico Mundani, ES. 2008. Reproducción de helechos por esporas [en línea]. España. Consultado 3 mayo 2008. Disponible en <http://www.jardin-mundani.es/siembra-helechos/Siembra-scolopendrium.htm>
- 10.10 Mendoza, J; Ruiz, G; Vargas A. 2005. Nuevo procedimiento para la propagación por esporas de *Phlebodium decumanum* y *Phlebodium pseudoaureum*, Nicaragua. In Seminario-taller de agrotecnología de plantas medicinales (2, 2003, HN) y Simposio internacional del género *Phlebodium* (1, 2003, HN). Memorias. Tegucigalpa, Honduras, Proyecto OEA – AICD. s.p.

- 10.11 Meza, E; Sota, E De la; Ferrucci, M. 2006. *Phlebodium aureum* (Polypodiaceae, Pteridophyta): su presencia en Argentina (en línea). Boletín Sociedad Argentina Botánica no. 41. Consultado 14 feb 2008. Disponible en: [http://www.botanicargentina.com.ar/boletin/41-1/Trabajo\\_5\\_Torres.pdf](http://www.botanicargentina.com.ar/boletin/41-1/Trabajo_5_Torres.pdf)
- 10.12 Moran, R. 1996. Polypodiaceae. In Davidse, G; Sousa, M; Chater, A. (eds.). Flora Mesoamericana v. 5. México, Universidad Nacional Autónoma de México / Missouri Botanical Garden / The Natural History Museum. p. 345-346.
- 10.13 OEA, HN; EXVECAM (Extractos Vegetales de Centroamérica, HN). 2006. Actualización de estudio de mercado de 10 especies de interés para la región: informe final. Guatemala, Proyecto de Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos / Proyecto SEDI/AE-089/05. p. 35.
- 10.14 Premierhort.com. 2008. Turba de *Sphagnum* canadiense [en línea]. Canadá. Consultado 9 mar 2008. Disponible en: <http://www.premierhort.com/website/products/eproducts/eprodconsumer/eprodconsother/peatmoss.html>
- 10.15 Ramírez, T. 2003. *Sphagnum* moss [en línea]. México. Consultado 9 mar 2008. Disponible en: <http://www.tonahtiu.com/notas/botanica/sphagnum.html>
- 10.16 Robles, G; Oliveira, K; Villalobos, R. 2000. Evaluación de los productos forestales no madereros en América Central [en línea]. Turrialba, Costa Rica, FAO / Olafo / CATIE. Consultado 18 feb 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/ae159s/AE159S06.htm>
- 10.17 Rosales Castillo, JM. 2005. Micropropagación de calahuala (*Phlebodium pseudoaureum* Cav.) con tres tipos de explantes en diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 59 p.
- 10.18 Salgado, R. 2004. La cascarilla de arroz: un excelente sustituto de la madera [en línea]. Hypatia 4(11). Consultado 15 jun 2008. Disponible en [http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=366&Itemid=260](http://hypatia.morelos.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=366&Itemid=260)
- 10.19 The Scotts Miracle Gro, US. 2006. Peat moss Miracle-Gro® [en línea]. US. Consultado 9 mar 2008. Disponible en: [http://www.scottssti.com/en/08\\_resources/fact\\_sheet/M-GroSphagnumPeatMoss06\\_sp.pdf](http://www.scottssti.com/en/08_resources/fact_sheet/M-GroSphagnumPeatMoss06_sp.pdf)
- 10.20 Tropicos.org; Missouri Botanical Garden, US. 2010a. *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. (en línea). US. Consultado 23 abr 2010. Disponible en <http://www.tropicos.org/Name/26602381>
- 10.21 \_\_\_\_\_. 2010b. *Sphagnum quinquefarium* (Lindb.) Warnst. (en línea). US. Consultado 23 abr 2010. Disponible en <http://www.tropicos.org/Name/35175061>

- 10.22 Vargas, C. 2004. *Phlebodium decumanum* Willd. In Seminario-taller de agrotecnología de plantas medicinales (2, 2003, HN) y Simposio internacional del género *Phlebodium* (1, 2003, HN). Memorias. Tegucigalpa, Honduras, Proyecto OEA – AICD. 7 p.
- 10.23 Xitumul Melchor, DF. 2009. Caracterización morfológica de la colección de calahuala (*Phlebodium* spp.). Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 68.

## ANEXO 1

### ASPECTOS DEL CULTIVO DE LA CALAHUALA

#### **Siembra**

Como una planta epífita, la siembra de ésta en el lugar definitivo debe hacerse en un sustrato o suelo preparado, para brindar adecuada aireación y buen drenaje. La siembra se hace en bordas de 45 cm de largo a una distancia entre plantas de 30 cm y entre bordas de 50 cm. La densidad promedio es de 40,000 plantas/mz (Vargas, 2004).

#### **Cuidados culturales**

Dentro de estos tenemos los siguientes:

-Considerar que las plantas tengan una humedad adecuada, tanto en el ambiente como en el suelo, para ello son preferibles realizar riegos cortos y frecuentes (Vargas, 2004).

-Hacer una correcta fertilización. Se recomienda hacer análisis de suelo y en general el cultivo requiere 200 kg de nitrógeno, 100 kg de fósforo y 10 kg de potasio por cada período de cosecha, aproximadamente 3 períodos al año (Vargas, 2004).

-Mantener la intensidad de luz necesaria, mediante el uso de sarán que proporciona sombra indirecta en porcentajes entre 60 – 90% (Vargas, 2004).

-Hacer un adecuado control de maleza. La forma de siembra y el desarrollo del cultivo dificulta labores de control mecánica por lo tanto debe hacerse en forma estrictamente manual (Vargas, 2004).

-Manejo de plagas. Los problemas más comunes han sido con insectos del género *Atta* (zompopos) y trips (Vargas, 2004).

-Manejo de enfermedades. Un mal drenaje del sustrato y la humedad relativa alta hace que la presencia de hongos patógenos sea considerada. En helechos los géneros más comunes son *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Curvularia*, que provocan manchas foliares, necrosis, clorosis y desprendimiento de la hoja (Vargas, 2004).

Estos pueden ocasionar pudrición en el rizoma de forma aguada y maceración la cual desprende un olor fétido (Vargas, 2004).

### **Cosecha y recolección**

La cosecha es realizada basándose en un patrón de maduración de las esporas y las hojas. Cuando la hoja ha botado todas las esporas y sus soros están casi vacíos, se procede al corte de hoja, el cual es exclusivo y estricto de hoja con soros vacíos (Vargas, 2004).

La recolección debe hacerse después del corte y pasar al secado para evitar pérdidas por degradación del material, tanto mecánicos como por fermentación (Vargas, 2004).

### **Secado**

El secado de la hoja consiste simplemente en remover el agua de la misma por medio de la elevación de la temperatura y reducción de la humedad relativa del aire, que en forma de una corriente pasa por las hojas y extrae la humedad que éstas contienen (Vargas, 2004).

### **Almacenamiento y conservación**

Una vez que las hojas se han secado y la humedad en ellas oscila entre un 8 – 10%, se procede a moler dichas hojas obteniendo un material fácil de almacenar en sacos. Los sacos ya pesados y rotulados se estriban en tarimas de madera en un lugar fresco y seco, bajo techo (Vargas, 2004).

En cuanto a la conservación, ésta se hace tomando en cuenta las medidas antes mencionadas, como la humedad adecuada para almacenar y así evitar problemas como el desarrollo de hongos y bacterias, además del cuidado del lugar que sea fresco y que se mantenga seco (Vargas, 2004).

### **Comercialización**

La empresa “Extractos Vegetales de Centroamérica” comercializa extracto de *Phlebodium decumanum* en diferentes formas farmacéuticas desde 1,990. Dichas formas incluyen jarabes, cápsulas, granulados, tinturas y extracto puro. Los productos comercializados son:

DIFUR	Unión Europea
RAPUANI	Suiza
LEUCOSTAT	Australia y Nueva Zelanda
DIFUR	Centroamérica
EPL	El Caribe

Igualmente en Europa se comercializa bajo el nombre de EXPL y como un suplemente alimenticio para pacientes con cáncer y deportistas de alto rendimiento. En la red de internet se promociona con la marca KALA W ALLA e INMUNO – C (Vargas, 2004).

Existen 3 problemas básicos en la producción y venta de este producto (Vargas, 2004):

- Altas inversiones agrícolas iniciales.
- Las restricciones legislativas farmacéuticas para obtener los registros sanitarios.
- Costo elevado de registros sanitarios en países desarrollados.

**Cuadro 10. Estudio de mercado de la Calahuala (*Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm.) (OEA-EXVECAM, 2006).**

Producción <sup>1</sup> (Kg/año)	6,000 (rizoma seco y hoja seca) 20,000 (rizoma y hoja fresca)
Precios <sup>2</sup> (Kg/US\$)	4.00 – 8.00 (rizoma seco) 6.00 – 20.00 (hoja seca)
Presentaciones frecuentes	Decocciones, tabletas, cápsulas, tinturas, extractos, jarabes, geles, granulados, cremas, shampoo, jabones.
Países productores <sup>3</sup>	Honduras, Brasil, Guatemala, Colombia, Cuba, Ecuador, México, Puerto Rico, Perú, Venezuela.
Países demandantes <sup>4</sup>	Unión Europea, Suiza, Australia, Nueva Zelanda, Centroamérica, México, EUA.

<sup>1</sup>Producción. El material vegetal que se comercializa proviene en un 80% de recolección silvestre o extractivismo.

<sup>2</sup>Precios. Cotizaciones promedio de compra a recolectores productores, varían según época, cantidad, calidad, etc.

<sup>3</sup>Países productores. Se refiere a países donde hay tradición de empleo y donde se obtiene por extractivismo y cultivo.

<sup>4</sup>Países demandantes. Se refiere a países que tradicionalmente han demandado estas especies (principalmente materia prima) para elaboración de productos naturales o fitoterápicos.

### Cuadro 11. Comercialización de Calahuala vía internet.

Nombre producto	Tipo y usos producto	Portal electrónico
Kalawalla <i>Polypodium leucotomos</i>	Los Europeos han utilizado el extracto de <i>P. leucotomos</i> por mas de 10 años como una manera de mantener el sistema inmune funcionando en su mejor nivel.	Honduras <a href="http://www.organichope.com">www.organichope.com</a>
IMMUNO-C <i>Phlebodium decumanum</i>	Used in most common Cancers are Breast, Cervical, Colon, Rectum, Endometrial, Kidney, Lung, Ovary, Pancreas, Prostate, Skin, Stomach and Urinary Bladder Cancer. Has been tried in most of these cases with surprising results.	Honduras <a href="http://www.organichope.com">www.organichope.com</a>
Raintree's Amazon Vitality 120 Capsules	Calaguala ( <i>Polypodium leucotomos</i> ) and Samambaia ( <i>Polypodium decumanum</i> ). A herbal extract of these rare rainforest ferns is manufactured and sold in Europe (anapsos) as a herbal drug for the treatment of psoriasis, and more recently, for dementia and Alzheimer's Disease.	<a href="http://www.healthyheartht.info">www.healthyheartht.info</a>
Samambaia Powder Raintree	For psoriasis and other skin conditions; for Alzheimer's disease, dementia, and memory problems; for coughs, bronchitis, colds, and	<a href="http://www.rain-tree.com">www.rain-tree.com</a>

Nutrition's samambaia whole herb powder ( <i>Polypodium sp</i> )	other respiratory problems; for autoimmune disorders; as a general tonic (strengthens overall body functions); a cellular-protector, and anti-aging	
---	---	--

Tomado de OEA-EXVECAM (2006). Pág. 35.

## ANEXO 2

### CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS

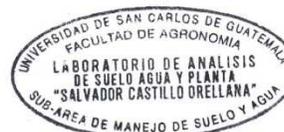


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
LABORATORIO DE SUELO-PLANTA-AGUA "SALVADOR CASTILLO ORELLANA"



**INTERESADO: GLENDA RODAS**  
**FECHA DE INGRESO: 30/3/09**  
**ANÁLISIS DE SUSTRATOS EN AGUA**

IDENTIFICACION	pH	$\mu\text{S/cm}$ C.E.	%				ppm				%	%
			P	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe	Mn	M.O	HUMEDAD
PEAT MOSS	5.6	1190	5.29	113	0.75	0.88	0.00	0.50	2.50	0.00	61.32	17.44
CASCARILLA DE ARROZ	6.3	2010	52.68	740	0.12	0.37	0.00	0.50	5.00	6.00	56.10	11.13
ARENA BLANCA	9.0	158.5	3.53	33	0.12	0.01	0.00	0.00	2.00	0.00	0.07	0.18



**ANEXO 3**  
**DATOS DE LABORATORIO PARA LA ENTRADA Y SALIDA DEL PROGRAMA InfoStat**

**Cuadro 12. Registro de la producción de prótalos y tiempo de germinación por unidad experimental.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																			
	R1		R2		R3		R4		R5		R6		R7		R8		R9		R10	
	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG	PP	TG
<b>T1 (MS 100%)</b>	30	37	45	37	50	37	55	37	45	37	60	33	70	33	75	33	75	37	45	37
<b>T2 (MS 75%)</b>	60	37	80	37	40	37	60	33	70	33	75	33	55	33	70	30	75	37	45	37
<b>T3 (MS 50%)</b>	78	33	80	33	95	33	85	30	80	33	85	33	85	30	95	33	95	33	85	33
<b>T4 (MS 25%)</b>	95	30	100	30	85	30	85	33	80	33	95	30	95	30	85	30	95	30	95	30

(Basado en Rosales, 2005. Página 33)

**Referencias:** PP = Porcentaje de producción de prótalos por unidad experimental.

TG = Tiempo de germinación promedio por unidad experimental (días).

**Cuadro 13. Registro de esporofitos jóvenes y altura promedio por unidad experimental.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES																			
	R1		R2		R3		R4		R5		R6		R7		R8		R9		R10	
	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP	NE	AP
<b>T1 (MS 100%)</b>	464	0.81	680	1.05	848	0.91	552	0.87	428	1.07	424	0.68	560	0.75	808	0.87	600	0.86	616	1.00
<b>T2 (MS 75%)</b>	328	1.27	1008	1.43	1288	1.37	1088	1.33	791	1.16	756	1.31	800	1.28	553	1.07	518	1.24	800	1.32
<b>T3 (MS 50%)</b>	888	1.14	581	1.03	968	1.24	512	0.86	539	0.96	992	1.02	368	0.95	616	0.82	833	1.06	660	1.20
<b>T4 (MS 25%)</b>	158	0.87	167	0.92	142	0.90	142	0.95	133	0.76	158	1.00	158	0.79	142	0.81	158	1.00	1	0.91

(Basado en Rosales, 2005. Página 33)

**Referencias:** NE = Número esporofitos jóvenes por unidad experimental.

AP = Altura promedio de esporofitos jóvenes por unidad experimental (cm).

**Cuadro 16. Registro de esporas germinadas como prótalos y tiempo por unidad experimental.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES							
	R1		R2		R3		R4	
	PE	TG	PE	TG	PE	TG	PE	TG
<b>T1 (Peat moss)</b>	9.38	19	10,26	20	8.71	21	11,38	20
<b>T2 (Cascarilla de arroz mullida)</b>	2.16	26	7.04	27	3.08	28	2.82	27
<b>T3 (Arena blanca)</b>	0.00	51	0.00	52	0.00	53	0.00	52

(Basado en Rosales, 2005. Página 33)

**Referencias:** PE = Porcentaje de esporas germinadas como prótalos por unidad experimental.  
TG = Tiempo de germinación promedio como prótalos por unidad experimental (días).

## **ANEXO 4**

### **GLOSARIO**

#### **DERMATITIS ATÓPICA**

Enfermedad que consiste en un estado reaccional de la piel caracterizado por erupciones pruriginosas y con aspecto de escamas, más frecuente en niños

#### **ESPORA**

Célula reproductiva que posee la propiedad de dar origen a un nuevo organismo sin la intervención de otra célula.

#### **ESPORANGIO**

Estructura ubicada detrás de los frondes del helecho, que contiene las esporas.

#### **FRONDA**

Fronde. Hoja de los helechos.

#### **HAPLOIDE**

Célula que contiene un solo juego de cromosomas.

#### **INDUCIO**

En los helechos, órgano protector de los esporangios, generalmente de forma laminar y con forma característica para cada género.

#### **MUESCA**

Hueco ubicado en algún órgano, para recibir otro.

#### **NOVO**

Literalmente "de nueva procedencia", para referirse a algo no heredado.

#### **SORO**

Conjunto de esporangios, generalmente de color castaño.

#### **PRÓTALO**

Fase transitoria de la generación sexual de las pteridofitas. Se origina de una espora y semeja una hojuela cordiforme; en ella se forman el arqueogonio y los anterozoides.

**PSORIASIS**

Enfermedad inflamatoria crónica de la piel, no contagiosa, que produce lesiones escamosas, engrosadas e inflamadas

**QUELANTE**

Sustancia orgánica que se une con un metal.

**RIZOMA**

Tallo subterráneo con varias yemas que crece de forma horizontal emitiendo raíces y brotes herbáceos de sus nudos.

**VITÍLIGO**

Enfermedad cutánea caracterizada por la pérdida de pigmentación en ciertas áreas de piel, que ocasiona parches blancos e irregulares