



Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.2013.11(2):74-84



## ETAPAS DE DESARROLLO IN VITRO DEL GAMETOFITO DEL HELECHO ARBORESCENTE *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN.

### DEVELOPMENT STAGES IN VITRO OF GAMETOPHYTE OF THE TREE FERN *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN

Narváez-Parra Eliana Ximena<sup>1</sup>, Jerez-Jaimes Javier Hernando<sup>2</sup>, Mantilla-Serrano Julio Enrique<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro. Universidad de Santander UDES. Campus Lagos del Cacique. [enarvaez@udes.edu.co](mailto:enarvaez@udes.edu.co)

<sup>2</sup>Universidad Industrial de Santander UIS-Universidad de Santander UDES. [javjerez@gmail.com](mailto:javjerez@gmail.com)

<sup>3</sup>Corporación para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga. CDMB. [Julio.mantilla@cdmb.gov.co](mailto:Julio.mantilla@cdmb.gov.co)

#### Resumen

La familia Cyatheaceae se encuentra en el apéndice dos del CITES, lo que indica poblaciones estables sin riesgo de extinción. El género *Cyathea* tiene gran distribución a nivel nacional, en la región andina se registra el mayor número de especies hasta los 2500 m, siendo ésta una de las zonas que se ha visto afectada en los últimos años por perturbaciones del hábitat. En este estudio se evaluó la germinación de esporas de *Cyathea aff. caracasana* hasta la fase de gametofito mediante la técnica de cultivo in vitro usando el medio de cultivo MS al 50% sin carbón activado y sacarosa, en tres tratamientos: MS con antibiótico rifampicina (0,02 mg/L), MS con antifúngico orthocide (0,5 g/L) y MS con rifampicina (0,02 mg/L) y orthocide (0,5 g/L). El fotoperiodo fue de 12 horas, la temperatura de 18 °C y el pH de 5,8. La germinación de esporas se presentó entre los 18 y 22 días después de su siembra con un porcentaje del 69% (IG: 3,75), en el tratamiento con el medio MS y rifampicina (0,02mg/L). En los tratamientos con el fungicida orthocide no se observó germinación. Los gametofitos filamentosos se observaron a los 34-38 días, las células apicales meristemáticas se desarrollaron a los 43 días, las estructuras cordiformes se apreciaron a los 48 días. Los multigametofitos se observaron a los 78 días. Los valores de las variables fisicoquímicas utilizadas fueron apropiados. Se registraron y reconstruyeron las etapas de desarrollo del gametofito de *Cyathea aff. caracasana*.

**Palabras clave:** esporas, multigametofitos, prótalo, pteridofitos.

#### Abstract

Cyatheaceae family is found in Appendix Two of CITES, which indicates stable populations without risk of extinction. Although the genus *Cyathea* has great national distribution, in the Andean region has the highest number of species up to 2500 m, which is one of the areas affected in recent years by habitat disturbance. In this study, germination of spores by the technique of in vitro culture of *Cyathea aff. caracasana* on 50% MS culture medium was evaluated by three treatments: MS culture medium

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2013 .11 (2):74-84. Narváez-Parra E. X, Jerez-Jaimes J. H, Mantilla-Serrano J.E.ETAPAS DE DESARROLLO IN VITRO DEL GAMETOFITO DEL HELECHO ARBORESCENTE *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN.



75

without sucrose and activate carbon, with antibiotic rifampicin (0,02 mg/L), MS with antifungal orthocide (0,5 g/L) and MS with rifampicin (0,02 mg/L) and orthocide (0,5 g/L). The photoperiod was 12 hours per day, the temperature of 18 °C and pH 5,8. The germination of spores was present between 18 and 22 days after sowing with a germination percentage of 69 % (GI: 3,75), in the MS medium and rifampicin (0,02mg/L). In treatments with fungicide was not recorded spore germination. The filamentous gametophytes were observed at 34-38 days, apical meristematic cells developed at 43 days, cordiform structures were observed at 48 days. Multigametophytes were observed at 78 days. The values of the physicochemical variables used were appropriate. The gametophyte development stages of *Cyathea aff. caracasana* were recorded and reconstructed.

**Key words:** multigametophytes, prothallus, pteridophytes, spores.

\*Para citar este artículo: Narváez-Parra E.X.,Jerez-Jaimes J.H,Mantilla-Serrano J.E.ETAPAS DE DESARROLLO IN VITRO DEL GAMETOFITO DEL HELECHO ARBORESCENTE *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN.

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Narváez-Parra E.X. Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro. Universidad de Santander UDES. Campus Lagos del Cacique. enarvaez@udes.edu.co

Recibido:Noviembre 02 de 2012 Aceptado: Septiembre 30 de 2013

## Introducción

Los helechos arborescentes son característicos de los bosques lluviosos tropicales y subtropicales, por su belleza son utilizados como elementos de decoración en interiores y exteriores. La mayoría de estos helechos son colectados ilegalmente de los sitios naturales lo que da como resultado un descenso en las poblaciones (ETTER, 1993). El género *Cyathea* incluye cerca de 150 especies que están distribuidas principalmente en el Nuevo Mundo y en islas a través del Océano Pacífico (KORALL et al, 2007). La familia Cyatheaceae se encuentra en el apéndice dos del CITES, lo que indica que las poblaciones son estables y sin riesgo de extinción, pero si no se controla su explotación podrían entrar en peligro. En Colombia las especies de este género son utilizadas artesanalmente en la fabricación de cercas, vigas y postes por la gran resistencia que presentan los tallos, los peciolos y raquis son usados para la fabricación de cestos, canastas y particularmente en las épocas navideñas para la elaboración de coronas. La familia Cyatheaceae se encuentra representada en Colombia con los géneros *Alsophila*, *Cnemidaria*, *Cyathea* y *Sphaeropteris*, siendo el más numeroso *Cyathea*, encontrándose entre el nivel del mar y los 4.200 m. Este género está conformado por 55 especies y 5 variedades distribuidas en todo el país, el mayor número de especies se

registra en la región Andina, en alturas menores de 2.500 m. Se caracteriza por presentar tallos erectos que pueden alcanzar varios metros de altura, los peciolos dejan cicatrices marcadas alrededor del tallo (MURILLO-A y MURILLO-P, 2003). Entre los principales grupos de familias de las Cyatheales, las Cyatheaceae y Loxsomaceae presentan los elementos más primitivos. El prótalo en estas familias es de lento crecimiento y masivo, talo tipo cordado con una tendencia en algunas Cyatheaceae a revertir ocasionalmente a la forma tuberosa cilíndrica. Las esporas son de tipo tetraedral y la germinación de la forma primitiva tipo *Cyathea*; Constantino et al. (2000) diferenciaron dos tipos de esporas de helechos arborescentes, esporas clorófilas y esporas no clorófilas. Lloyd y Klekowsky (1970) habían determinado que las esporas clorófilas no presentan estado de dormancia, germinan directamente después de 36 horas y poseen una viabilidad de 48 días. Las esporas no clorófilas germinan después de 9,5 días y su viabilidad oscila entre 10 y 45 días.

En el género *Cyathea* los filamentos germinales son cortos en la formación de la placa. El desarrollo del prótalo es del tipo *Adiantum*, una célula meristemática se establece sólo cuando el talo tiene cuatro o cinco células de grosor. La célula terminal se divide por una pared perpendicular a la pared basal para iniciar la formación de la placa del prótalo. Los órganos sexuales son tipo Eusporangiados aunque la simplificación



77

de los anteridios en Cyatheoidea conducen al tipo Leptosporangiado (NAYAR y KAUR,1971).

Goller y Rybczyński (2007) estimaron para once especies de *Cyathea* los tiempos de germinación (cuatro a doce semanas), formación del gametofito (ocho a veinte semanas) y del esporofito (cuatro a catorce meses), así mismo reportan once meses como tiempo máximo de almacenamiento de las esporas de *Cyathea caracasana*, aunque no suministran datos sobre la germinación de las esporas. Hiendlmeyer y Randi (2007) determinaron que la luz es un factor importante en la germinación de las esporas, sugieren que la fotoinhibición de las esporas es un mecanismo que garantiza la germinación de las esporas y el establecimiento del gametofito en condiciones ambientales apropiadas, por tal motivo las esporas que son dispersadas en áreas abiertas pueden germinar en días nublados o lluviosos pero muy probablemente no sobrevivan días soleados. Los pteridofitos al igual que otras plantas establecen relaciones simbióticas con hongos micorrízicos para la germinación de las esporas, el desarrollo de gametofitos y esporofitos; Wang y Qiu (2006) en la revisión sobre la distribución filogenética y evolución de micorrizas reconocen el establecimiento de asociaciones micorrízicas arbusculares en *Cyathea cooperi* reportada por Gemma et al (1992) en

Hawái. La información sobre los procesos de germinación de esporas y desarrollo de gametofitos de *Cyathea* mediante la técnica de cultivo in vitro es escasa, lo que justifica este trabajo preliminar cuyo propósito fue evaluar el efecto de tres tratamientos en el medio de cultivo MS para promover la germinación de las esporas y la formación de la fase gametofítica de *Cyathea aff. caracasana*, así como las condiciones para su propagación in vitro y la posibilidad de generar a futuro estrategias de conservación.

### Metodología

Las pinas de *Cyathea aff. caracasana* fueron colectadas en la vía Bucaramanga-Cúcuta a una altura de 2398 m (Figura 1). El material vegetal fresco se guardó en bolsas de papel y bolsas ziploc debidamente etiquetado y se llevó al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro de la Universidad de Santander UDES LCTV, en donde se cambió a otras bolsas de papel para facilitar su secado a temperatura ambiente. Cuatro días después de la colección del material vegetal se procedió en la cámara de flujo laminar a separar los esporangios y las esporas de las pinas con una aguja de disección, posteriormente se distribuyeron en cinco bolsas de papel filtro con dimensiones de 4 cm x 4 cm, las cuales se ubicaron en cinco cajas de Petri estériles a las que se aplicaron dos aspersiones con etanol al 70% en dos



intervalos de 30 segundos como protocolo de desinfección. El material palinológico se distribuyó con pinzas de disección en 36 cajas de Petri que contenían el medio de cultivo *Murashige y Skoog* (1962) al 50% sin carbón activado y sacarosa, las cuales se dividieron en tres grupos de 12 cajas para evaluar el mejor desarrollo de las esporas hasta la fase gametofítica. Se aplicaron las siguientes modificaciones al medio de cultivo MS: medio MS con antibiótico rifampicina (0,02 mg/L), MS con antifúngico orthocide (0,5 g/L) y MS con rifampicina (0,02 mg/L) y orthocide (0,5 g/L). El pH de los tratamientos se ajustó a 5,8. Las cajas se etiquetaron, se sellaron con vinipel y se trasladaron a la cámara de incubación con un fotoperiodo de 12 horas a 18 °C.

Cada tres días se inspeccionaron las cajas de Petri para determinar si las esporas habían germinado. Una vez detectados los primeros crecimientos celulares se utilizó un microscopio digital Celestron para detallar este proceso.

## Resultados

La germinación de las esporas de *C. aff. caracasana* se detectó a los 18 días y continuó hasta los 22 días en el medio MS al 50% sin carbón activado y sacarosa, con rifampicina (0,02 mg/L) (Figura 2A), en los otros tratamientos que incluían el antifúngico orthocide (0,5 g/L) no se evidenció la germinación de las esporas. Los estimativos de la

germinación de esporas se realizaron indirectamente según el grado de cobertura de los gametofitos en las 12 cajas de Petri, se usó la escala de Braun-Blanquet, en la que se combina la abundancia y la dominancia (Tabla 1), en donde los índices inferiores (+, r) registran la abundancia y los restantes (1, 2, 3, 4, 5) tienen en cuenta la cobertura o dominancia (ALCARAZ, 2012). En esta investigación, esta escala se modificó, considerando sólo los índices 1-5 de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 2). Estos datos son medianas de frecuencias de la evaluación de tres repeticiones con cuatro cajas de Petri cada una. La desinfección con etanol de esporangios y esporas mediante aspersión no causó efectos adversos en el índice de germinación. El patrón de germinación es del tipo *Cyathea* (ecuatorial) donde dos células se forman en la germinación, una produce el rizoide y la otra el filamento germinal. La primera división celular se inició por una pared paralela al eje polar de la espora y la elongación del talo es un plano paralelo al plano ecuatorial de la espora. El desarrollo del prótalo es de tipo-*Adiantum* aunque el desarrollo de rizoides en la segunda o tercera célula del prótalo lo hacen similar al tipo *Drynaria* (Figura 2E). El desarrollo de la espora, clorocito y gametofito filamentoso se aprecian en las figuras 2 B-E. Los cloroplastos desarrollados en el gametofito se observan claramente en la



figura 2F. Los gametofitos filamentosos mayores de diez células se observaron a los 16 días después de la germinación. Las células apicales meristemáticas se desarrollaron a los 21 días haciéndose más complejos hasta la formación de la estructura gametofítica cordiforme a los 26 días (Figuras 3 y 4), así mismo se observaron estructuras esféricas sobre la lámina de los gametofitos identificadas como anteridios. Treinta días después de la formación de los gametofitos cordiformes se observaron estructuras multigametofíticas derivadas del proceso de gemación de células meristemáticas no observadas en este estudio (Figura 4C). La figura 5 resume el tiempo y estructuras de desarrollo observadas en *Cyathea aff. caracasana*.

### Discusión

En el presente estudio los tratamientos que contenían el fungicida Orthocide inhibieron el proceso de germinación de las esporas de *Cyathea aff. caracasana*. Los resultados obtenidos son congruentes con lo expuesto por Dyer (1979) en lo referente al uso de mecanismos de control de hongos, dichos elementos fungicidas aumentan el tiempo de germinación y disminuyen la viabilidad de las esporas de los helechos. El compuesto activo del orthocide es el *N*-(trichloro methylthio) cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide [C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>S]. Los fungicidas de este grupo, al penetrar en la célula fúngica reaccionan preferentemente con las enzimas que

contienen grupos sulfhidrilos (SH), también puede reaccionar con grupos de aminoácidos. Estos fungicidas de igual forma pueden inhibir la síntesis de enzimas que no tienen grupos sulfhidrilo. La acción fungitóxica de este grupo de fungicidas está inherente en el grupo N-S-CCl<sub>3</sub>. Los compuestos de este grupo reaccionan con el tiol y el glutatión (TAVARES-RODRIGUES, 2006). Si se inhibe el glutatión no hay control sobre la formación de enlaces disulfuro y las proteínas se inhiben. Las esporas de *Cyathea aff. caracasana* son no clorofíticas presentando una gran reserva de lípidos que son transformados a través del ciclo del glioxilato a carbohidratos que sirven como fuente de energía para los inicios de la germinación. Se desconoce si Orthocide inhibe algunas de las enzimas de este ciclo en las esporas de *Cyathea aff. caracasana*. Las variables luz (fotoperiodo de 12 horas) y pH (5,8) fueron convenientes para la germinación de las esporas y el desarrollo del prótalo. Los valores de pH por debajo de la neutralidad favorecen la germinación de las esporas según lo reportado para *Cyathea atrovirens* (RECHENMACHER et al, 2010). La luz es necesaria para la formación del prótalo, pero cantidades elevadas de iluminación eliminan al gametofito (HIENDLMEYER y RANDI, 2007). Alrededor del 68,8% (valor medio del índice de germinación= 3,75) de las esporas sembradas en el medio de





80

cultivo MS 50% sin carbón activado y sacarosa, con 0,02 mg/L del antibiótico rifampicina germinaron y completaron su desarrollo hasta la fase gametofítica.

Durante el desarrollo del gametofito de *Cyathea aff. caracasana* se observó que la diferenciación del clorocito y el rizoide se produce alrededor de los 15-18 días. La formación del gametofito filamentosos (cinco células) se logra en un tiempo de cuatro a cinco días después de la germinación. Se evidenció el desarrollo de rizoides en la segunda y tercera célula del gametofito filamentosos. La fase filamentosos del gametofito inició a los 16 días de la germinación de las esporas, se apreció el desarrollo del gametofito en estado laminar a los 21 días y proliferación gametofítica en forma de corazón a partir de la actividad de las células meristemáticas con incremento en el número de células y expansión superficial sobre el medio de cultivo.

En lo referente al tiempo de germinación de las esporas bajo condiciones de cultivo in vitro, Page (1979) planteó que en la mayoría de especies de Cyatheaceae la capacidad de germinación de esporas disminuye después de unas pocas semanas de almacenamiento, lo que es típico para plantas tropicales. En este trabajo el tiempo máximo de almacenamiento de los esporangios y esporas fue de cuatro días, por lo que se infiere que no afectó la viabilidad de las mismas. Adicionalmente, el tiempo requerido para

la germinación también depende de la aplicación de soluciones desinfectantes, lo que puede afectar su viabilidad y poder de germinación (GOLLER y RYBCZYŃSKI, 2007). El etanol ha sido utilizado como complemento a la desinfección de esporas de helechos con NaOCl, pero en tiempos muy cortos y sumergiendo las muestras de las esporas (CAMLOHA y GOGALA, 1992; GONZALEZ et al, 2006). Dyer (1979) probó numerosas soluciones de esterilización entre ellas el NaOCl, Ca (OCl)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y concluyó que la mayoría de desinfectantes de hongos y bacterias extienden el tiempo requerido para la germinación de esporas y disminuyen su viabilidad. En esta investigación se usó etanol al 70% como agente de esterilización, lo que permitió obtener resultados satisfactorios en la viabilidad de las esporas para la germinación, la cual se evidenció a los 22 días de la inoculación de los esporangios y esporas en los medios de cultivo que contenían rifampicina, este tiempo fue similar al reportado para *Cibotium glaucum* (Sm.) Hook. And Arn., *Cyathea dealbata* (G. Forest) Sw y *Dicksonia sellowiana* Hook, (cuatro semanas) de igual forma para *Cibotium schiedeii* Schltdl. and Cham y *Cyathea robertsiana* (F. Muell.) Domin. (cinco semanas) (GOLLER y RYBCZYŃSKI, 2007), además este procedimiento permitió mantener las cajas de Petri libres de contaminantes bacterianos. Salisbury y Ross (1994),



argumentan que la exposición de las esporas a tiempos prolongados con etanol puede alterar la composición química de la pared celular, la membrana y por lo tanto la germinación. El tiempo de exposición (60 s) de las esporas al etanol no alteró la estructura interna.

El porcentaje de germinación de esporas del 69% (IG: 3,7) permite inferir que los métodos utilizados fueron adecuados para el estudio de la germinación y desarrollo de gametofitos de *Cyathea aff. caracasana*.

La proliferación de gametofitos debida a la extensión de los cultivos en medios carentes de sacarosa y envejecidos (más de dos meses) fue observada en *Cyathea aff. caracasana*, encontrándose gametofitos libres y múltiples, proceso que ocurre de forma similar en *Cyathea robertsiana* según lo reportado por Goller y Rybczyński (2007) quienes consideraron esta estrategia para la obtención de material vegetal como óptima para la propagación y estudios de desarrollo en pteridofitos arborescentes.

A partir del conocimiento de las características de germinación, los estados de desarrollo del gametofito, las condiciones de los medios de cultivo, el efecto de los fungicidas y las variables físico químicas analizadas en esta investigación, se continuarán los estudios para determinar el proceso de formación de esporofitos y estandarizar el cultivo in vitro de *Cyathea aff. caracasana*.

## Conclusiones

Se reconstruyeron las secuencias de las fases de desarrollo del gametofito de *Cyathea aff. caracasana*.

La germinación in vitro de esporas de *Cyathea aff. caracasana* se presentó en el tratamiento con el medio de cultivo MS al 50% sin carbón activado y sacarosa, con el antibiótico rifampicina (0,02 mg/L). Los tratamientos con el antifúngico orthocide (0,5 g/L) inhibieron el proceso de germinación.

El protocolo de desinfección de esporangios y esporas con aspersiones de etanol resultó adecuado para la germinación y para mantener libres de patógenos los medios de cultivo.

Se obtuvo el desarrollo in vitro de esta especie hasta la fase gametofítica a los 48 días.

Las variables pH, fotoperiodo y temperatura fueron apropiadas para los procesos de germinación de las esporas, formación y desarrollo de gametofitos.

La formación de multigametofitos promete ser una estrategia para la reproducción in vitro de *C. aff. Caracasana*

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Nancy Aguilar Villamizar Auxiliar de Investigación del laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro de la Universidad de Santander UDES, al Biólogo Fernando Caroprese y a los estudiantes Humberto León (Geología) y Ximena Melo (Ingeniería Química) de la Universidad Industrial de





82

Santander por la colaboración en la colecta del material de estudio.

### Referencias Bibliográficas

Alcaraz A. F. J (2012). El Método Fitosociológico. Geobotánica, Tema 11. Universidad de Murcia, España. <http://www.um.es/docencia/geobotanica/ficheros/tema11.pdf> Febrero de 2013

Camloha M and Gogala N (1992). In vitro culture of *Platycerium bifurcatum* gametophytes. *Scientia Horticulturae* **51**:343-346.

Constantino S, Santamaria L. M, and Hodson E (2000). Storage and in vitro germination of tree fern spores. *Botanic Gardens Micropropagation News* **2(4)**: 58-60.

Dyer A. F (1979). The culture of fern gametophytes for experimental investigation, pp. 253-305 in A. F. Dyer. The experimental biology of ferns. Academic Press, London.

Etter A (1993). Diversidad Ecosistémica Hoy. En: Nuestra Diversidad Biológica. Cerec y Fundación Alejandro Ángel Escobar.

Gemma J. N, Koske R. E, and Flynn T (1992). Mycorrhizae in Hawaiian pteridophytes: occurrence and evolutionary significance. *Am. J. Bot.* **79**:843-852.

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

González R. H, Herrera M. J. A y Ramos V. A. C (2006). Multiplicación in vitro de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott, a partir de esporas. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* **12**:141-146.

Hiendlmeyer R, and Randi A. M (2007). Response of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadii* Sternb.(Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta bot. bras.* **21(4)**: 909-915

Korall P, Conant D. S, Metzgar J. S, Schneider H and Pryer K. M (2007). A molecular phylogeny of scaly tree ferns (Cyatheaceae). *American Journal of Botany* **94**: 873-886.

Lloyd R. M and Klekowski E. J (1970). Spore Germination and Viability in Pteridophytes: Evolutionary significance of chlorophyllous spores. *Biotrópica* **2(2)**:129-137.

Murashige T, and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.

Murillo-A J y Murillo-P M T (2003). Pteridofitos de Colombia IV. Novedades en *Cyathea* (Cyatheaceae). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **27(102)**: 45-51

Nayar B. K and Kaur S (1971). Gametophytes of Homosporous Ferns. *The Botanical Review* **Vol** 37.

Page C. N (1979). Experimental aspects of fern biology, pp. 552-585 in A.F. Dyer. The

83

experimental biology of ferns. Academic Press, London.

Rechenmacher C, Schmitt JL, and Droste A (2010). Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) under different pH conditions. *Braz. J. Biol.* **70** (4) (suppl.), p. 1155-1160

Salisbury F. B y Ross C. W (1994). Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México.

**Tabla 2.** Índice de germinación de esporas de *Cyathea aff. caracasana*

Tres set de cuatro cajas de Petri cada uno	Índice de germinación* intervalo inferior $\geq$ mediana $\leq$ intervalo superior
1	$1.0 \geq 3.0 \leq 4.0$
2	$3.0 \geq 4.2 \leq 5.0$
3	$2.0 \geq 4.0 \leq 5.0$

\*Índice de germinación: 1= cobertura menor del 5%;  
2= cobertura del 5-25%; 3=cobertura del 25-50%;  
4= cobertura del 50-70%; 5= cobertura igual o superior al 75%.

Tavares-Rodrigues M. A (2006). Classificação de fungicidas de acordo como mecanismo de ação proposto pelo frac. Tesis de Maestría. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Agronómicas. Campus de Botucatu.

Wang B and Qiu Y. L (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**:299-363.



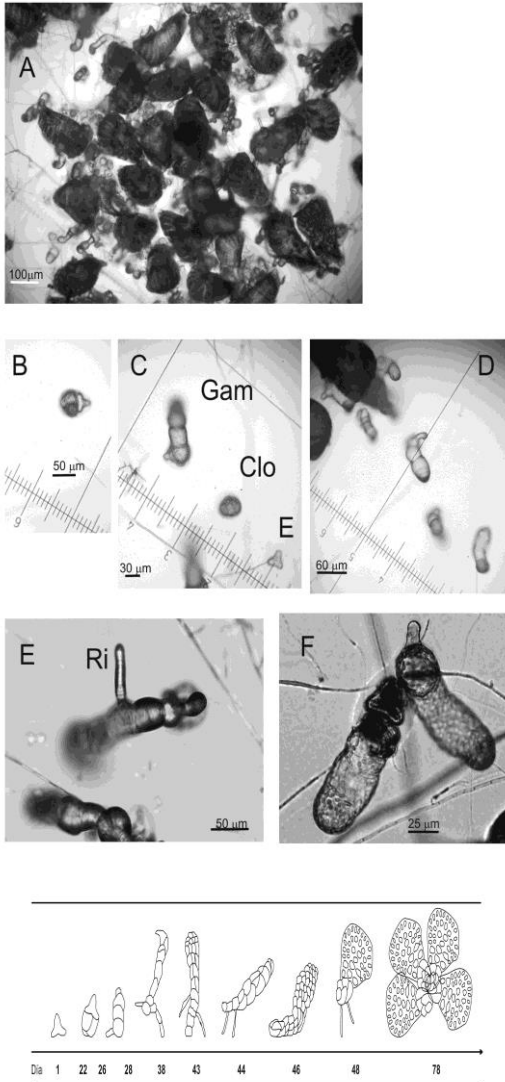
**Figura 1.** Lugar de colección de las pinas fértiles de *Cyathea aff. caracasana*.

**Tabla 1.** Escala de abundancia-dominancia de Braun-Blanquet

Índice	Significado
R	Un solo individuo, cobertura despreciable
+	Más individuos, cobertura muy baja
1	Cobertura menor del 5%
2	Cobertura del 5-25%
3	Cobertura del 25-50%
4	Cobertura del 50-75%
5	Cobertura igual o superior al 75%

84

**Figura 2.** Desarrollo del gametofito de *Cyathea aff. caracasana*. A, Esporangio con esporas y prótalos en. B, C, D, E y F, fases de desarrollo del prótalo. Clo: clorocito, E: espora trilete. Gam: gametofito. Ri: rizoides. Nótese los cloroplastos en las células del gametofito en estado filamentoso y rizoides en E y F.



**Fig.** Etapas de desarrollo en la formación de gametofitos en *Cyathea aff. caracasana*. Nótese que 30 días después de la formación de gametofitos cordiformes aparecen multigametofitos por gemación.

Bistua:Revista de la Facultad de Ciencias Basicas. 2013 .11 (2):74-84. Narváez-Parra E. X, Jerez-Jaimes J. H, Mantilla-Serrano J.E.ETAPAS DE DESARROLLO IN VITRO DEL GAMETOFITO DEL HELECHO ARBORESCENTE *Cyathea aff. caracasana* (KLOTZSCH) DOMIN.