

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**UTILIZACION DE MATRICES DE ALGINATO DE CALCIO PARA
EL ENCAPSULAMIENTO DE ESPORAS DE HELECHOS
NATIVOS CON IMPORTANCIA ORNAMENTAL.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

NOMBRE: CLAUDIO HERIBERTO HUAIQUIL ELLADO

TEMUCO – CHILE

2010

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**UTILIZACION DE MATRICES DE ALGINATO DE CALCIO PARA
EL ENCAPSULAMIENTO DE ESPORAS DE HELECHOS
NATIVOS CON IMPORTANCIA ORNAMENTAL.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

NOMBRE: CLAUDIO HERIBERTO HUAIQUIL ELLADO

PROFESOR GUIA: RUBEN CARRILLO LOPEZ

TEMUCO – CHILE

2010

Utilización de matrices de alginato de calcio para el encapsulamiento de esporas de helechos nativos con importancia ornamental.

PROFESOR GUÍA

: Nota:

RUBEN CARRILLO LOPEZ
Bachiller en Ciencias Biológicas
Magíster en Ciencias mención Botánica
Facultad de Cs. Agropecuarias y
Forestales, Universidad de la Frontera

PROFESOR CONSEJEROS

: Nota:

MARCELO RODRIGUEZ BERAUD
Ingeniero Agrónomo
Magister en Ciencias
Escuela de Agronomía
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales
Universidad Católica de Temuco

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

AGRADECIMEINTOS

A mis Profesores guía y consejero en especial a Don Rubén Carrillo López, Académico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera por su disposición y confianza entregada para la realización de este trabajo de tesis.

A mi familia por su constante apoyo y a todas aquellas personas que colaboraron de alguna u otra forma en la ejecución de este trabajo, amigos y compañeros.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Antecedentes generales de la flora Pteridophytica.	3
2.2 Clasificación botánica de los helechos.	4
2.3 Distribución geográfica de los helechos.	5
2.4 Distribución de helechos en Chile.	5
2.4.1 Distribución de los helechos en el sur de Chile.	6
2.5 Ciclo de vida de los helechos.	7
2.6 Morfología de los helechos.	9
2.6.1 Raíz	9
2.6.2 Tallo	9
2.6.3 Hojas	9
2.6.4 Esporangio	10
2.6.5 Esporas	11
2.7 Conservación de los helechos en Chile.	12
2.8 Descripción de helechos a evaluar.	13
2.8.1 Familia: <i>Adiantaceae</i>	13
2.8.1.1 <i>Adiantum chilense</i> Kaulf	13
2.8.1.2 <i>Adiantum sulphureum</i> Kaulf	14
2.8.2 Familia <i>Blechnaceae</i>	14
2.8.2.1 <i>Blechnum chilense</i> (Kaulf.) Mett.	14
2.8.2.2 <i>Blechnum hastatum</i> Kaulf.	15
2.8.3 Familia <i>Dicksoniaceae</i>	15
2.8.3.1 <i>Lophosoria quadripinnata</i> (J.F. Gmel.) C. Chr.	15
2.8.4 Familia <i>Dryopteridaceae</i>	16
2.8.4.1 <i>Rumohra adiantiformis</i> (G. Forster) Ching	16

2.9	Utilización e importancia económica de los helechos.	17
2.9.1	Antecedentes de mercado interno para helechos.	18
2.9.2	Antecedentes de Mercado externo para helechos.	18
2.10	Cultivo de helechos.	20
2.10.1	Uso de técnicas tradicionales.	20
2.10.2	Propagación por esporas.	20
2.10.2.1	Viabilidad de Esporas de Helechos.	21
2.10.3	Propagación por estolones.	22
2.10.4	Propagación por división de Rizomas.	22
2.10.5	Propagación Cultivo <i>in vitro</i> .	22
2.10.6	Medios de Cultivos.	23
2.11	Alginato.	24
2.11.1	Antecedentes generales de alginato.	24
2.11.2	Composición y extracción de Alginato de calcio.	24
2.11.3	Propiedades y usos de alginato.	24
2.11.4	Encapsulamiento de Células	26
3	MATERIAL Y MÉTODO	27
3.1	Materiales	27
3.1.1	Lugar de estudio.	27
3.1.2	Obtención de muestras en terreno.	27
3.1.3	Material vegetal.	27
3.1.4	Materiales de Laboratorio y Terreno	28
3.1.5	Equipos	28
3.2	Métodos	29
3.2.1	Elección días de muestreos.	29
3.2.2	Colecta de material vegetal.	29
3.2.3	Criterio de selección de frondas	29
3.2.4	Obtención de esporas	30
3.2.5	Elaboración de matrices de alginato de calcio	32
3.2.6	Esterilización del Sustrato.	32

3.2.7	Siembra de Esporas	32
3.2.8	Cámara de germinación	32
3.3	Ensayo N° 1. Inclusión de esporas de helechos en esferas de alginato de calcio para su posterior siembra en sustrato esterilizado.	33
3.3.1	Proceso de Conteo de esporas.	34
3.3.2	Elaboración de esferas de alginato de calcio e incorporación de esporas.	34
3.3.2.1	Equipos para la elaboración de esfera de alginato.	35
3.3.3	Diseño de siembra.	37
3.4	Ensayo N° 2. Tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas y sin encapsular.	37
4	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	40
4.1	Elaboración de matrices de alginato de calcio.	40
4.2	Número de esporas incluidas en esferas de alginato de calcio.	42
4.3	Tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas y sin encapsular.	43
4.3.1	<i>Adiantum chilense</i>	43
4.3.2	<i>Blechnum hastatum</i>	46
4.3.3	<i>Lophosoria quadripinnata</i>	48
4.3.4	<i>Rumohra adiantiformis</i>	50
4.3.5	<i>Adiantum sulphureum</i>	52
4.3.6	<i>Blechnum chilense</i>	52
4.3.7	Discusión general	53
5	CONCLUSIONES	55
6	RESUMEN	56
7	SUMMARY	57
8	LITERATURA CITADA	58

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1.	Espectro biológico de la flora pteridofítica de Chile Continental e Islas Oceánicas	6
Cuadro 2.	Principales países importadores de follaje fresco desde Chile	19
Cuadro 3.	Helechos nativos, nombre científico y común.	27
Cuadro 4.	Localidad de colecta de las distintas especies de helechos.	29
Cuadro 5.	Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos.	38
Tabla N° 1.	Elaboración de esferas de alginato de calcio	40
Tabla N° 2.	Conteo y número de esporas por esfera.	42
Tabla N° 3.	Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. <i>Adiantum chilense</i> .	45
Tabla N° 4.	Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. <i>Blechnum hastatum</i> .	47
Tabla N° 5.	Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. <i>Lophosoria quadripinnata</i> .	49
Tabla N° 6.	Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. <i>Rumohra adiantiformis</i> .	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de los Pteridophytos	7
Figura 2.	Diversas frondas de Pteridophytos	10
Figura 3.	Esporangios con esporas de <i>Adiantum chilense</i>	11
Figura 4.	Proceso de obtención de esporas	30
Figura 5.	Esporas de las distintas especies de helechos utilizadas en el ensayo	31
Figura 6.	Cámaras de germinación.	33
Figura 7.	Conteo de esporas	34
Figura 8.	Bomba peristáltica y matraces para la elaboración de esferas de alginato de calcio	35
Figura 9.	Proceso de siembra de esferas con esporas	36
Figura 10.	Diseño de siembra de esporas de helecho para cada especie.	37
Figura 11.	Prótalos generados a partir de esporas incluidas en la esfera de alginato de calcio. <i>Adiantum chilense</i> .	39
Figura 12.	Esferas de alginato de calcio elaboradas para el encapsulamiento de esporas de helechos nativos.	41
Figura 13.	Esfera de Alginato de Calcio con inclusión de esporas.	43
Figura 14.	Observación macroscópica de prótalos <i>Adiantum chilense</i>	44
Figura 15.	Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. <i>Adiantum chilense</i> .	45
Figura 16.	Observación macroscópica de prótalos <i>Blechnum hastatum</i> .	46
Figura 17.	Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. <i>Blechnum hastatum</i>	47
Figura 18.	Observación macroscópica de prótalos <i>Lophosoria quadripinnata</i> .	48
Figura 19.	Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. <i>Lophosoria quadripinnata</i> .	49

Figura 20.	Observación macroscópica de prótalos <i>Rumohra adiantiformis</i> .	50
Figura 21.	Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. <i>Rumohra adiantiformis</i> .	51
Figura 22.	Comparación del promedio de tiempo para la observación macroscópica de prótalos a partir esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular, de seis especies de helechos nativos.	53

1 INTRODUCCION

En Chile, las condiciones geográficas y climáticas permiten observar una alta variedad de ecosistemas naturales, donde la importancia de este tipo de estructuras (formadas a lo largo del período evolutivo) ha sido fundamental para la sobrevivencia de las diversas asociaciones vegetales en cuanto a su composición, estructura y funcionalidad. Sin embargo, a través del tiempo estas relaciones han sufrido un constante desequilibrio lo que ha generado que parte importante vean amenazada su sobrevivencia y la relación de interdependencia que en ellos se produce como es el caso de muchas asociaciones boscosas nativas del sur de nuestro país.

Uno de los factores (quizás el de mayor importancia) que ha generado tal desequilibrio es la intervención antrópica debido a que, históricamente el hombre ha incorporado extensas áreas para sus actividades, tanto para el incremento de la urbanización como también para sus actividades agrícolas, pecuarias y en este último tiempo el reemplazo de ecosistemas boscosos nativos por especies de rápido crecimiento. Esto ha generado un incremento paulatino de especies vegetales nativas que presentan problemas de conservación, que amenazan la sobrevivencia de estas especies, las cuales en mucho de los casos presentan una distribución restringida en ambientes de alta fragilidad. Entre estas especies se encuentra un grupo primitivo de plantas, correspondiente a la flora pteridophytica, que de acuerdo a su evolución obtenida han colonizado principalmente zonas naturales de mayor humedad donde se observan diversas formas de vida y crecimiento.

Hoy en día existen varios métodos para la propagación de un número importante de helechos que son utilizados como especies ornamentales, sin embargo, aún no existen estudios acabados acerca de un mejor y mayor aprovechamiento de las estructuras reproductivas que estos presentan, ya que el éxito de propagación a través de esporas depende en gran medida de la viabilidad y manejo que se les otorgue previo al cultivo.

El encapsulamiento de células en geles de alginato de calcio es un método utilizado actualmente en agricultura que tiene por objetivo proteger temporalmente a los microorganismos

encapsulados de las condiciones ambientales del suelo y de la competencia microbiana, además de generar una liberación gradual de estos en el tiempo. Así, la inclusión de células en este tipo de sustancias es reconocida como una forma rápida, no tóxica, económica y versátil. Por lo tanto, una de las condiciones que conlleva a un buen aprovechamiento de las esporas de helechos es que puedan ser incluidas en matrices con la finalidad de optimizar el manejo y mejorar el aprovechamiento de estos propágulos, al mismo tiempo asegurar el asentamiento de la futura planta.

El objetivo general de este estudio es establecer un protocolo que permita la inclusión de esporas de helechos nativos en matrices de alginato de calcio.

Para alcanzar dicho objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Elaborar matrices de alginato de calcio, que permitan el encapsulamiento de esporas de seis especies de helechos nativos.
- Estimar el número aproximado de esporas contenidas para cada una de las matrices.
- Determinar la factibilidad de utilización de una técnica que permita la inclusión de esporas de helechos en matrices de alginato de calcio y el posterior desarrollo de prótalos.
- Evaluar el tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas en esferas de alginato y esporas sin encapsular.

Hipótesis asociada

- Hipótesis: Es posible el encapsulamiento de esporas de helechos en esferas de alginato de calcio para la posterior generación de prótalos.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales de la flora Pteridophytica.

Al colonizar la tierra, en el transcurso de la evolución, los vegetales se enfrentaron al problema de abastecimiento hídrico, el cual no se presentó mientras vivían en ambientes acuáticos (Godoy *et al.*, 1981). Con la aparición de las angiospermas en el medio terrestre-aéreo se produjo el desplazamiento de diversos grupos de vegetales primitivos, entre los que podemos encontrar algunos que no presentaron la capacidad de adaptación suficiente a las nuevas condiciones. Sin embargo, un grupo de plantas, los Pteridofitos, que como señala Carrillo (2000), pertenecen en la escala evolutiva, a un grupo primitivo y que se ubica entre los musgos y las plantas con semillas, pudieron adecuarse a los cambios debido a que poseían formas de crecimiento que le permitieron establecerse en los nuevos hábitat creados por las Angiospermas, gracias a su plasticidad morfofisiológica, llegando a conquistar durante el período Carbonífero, una gran variedad de hábitat acuáticos, palustres, aéreos y terrestres (Godoy *et al.*, 1981).

Sánchez *et al.*, (2008), señala que la flora pteridofítica es un grupo de plantas que se desarrollan en una gran variedad de ambientes como en los bosques mesófilos de montaña, en bosques de encino, de pino, en selvas altas perennifolias, además se encuentran en matorrales xerófilos y en vegetación acuática. Este tipo de vegetación es conocida como plantas vasculares sin semillas y comprenden alrededor de 12.000 especies alrededor del mundo, y pueden estar presentes en todo tipo de vegetación y en altitudes que oscilan entre 0 y 5.000 m. s. n. m. (Ramírez y Sánchez, 2007).

Los pteridophytos o helechos comúnmente conocidos forman parte de la vegetación natural tanto de bosques templados como de bosques tropicales y presentan características muy particulares en su ciclo de vida como es el caso de la alternancia de generaciones (Ramírez *et al.*, 2000).

En Chile continental e insular existen alrededor de 170 especies de helechos, de los cuales la gran mayoría se encuentran en el Archipiélago de Juan Fernández y bosques del sur del país, debido a que en estas zonas existen las condiciones ambientales favorables de humedad y de sombra para su desarrollo (Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, a través de los años diversas especies han sufrido una influencia negativa producto de fenómenos geológicos y climatológicos ocurridos en la naturaleza lo que ha disminuido su número y diversidad. Posteriormente, otros factores como la intervención del hombre han producido que muchas de estas comunidades de helechos hoy en día presentan problemas de conservación. Principal peligro de extinción corren numerosos helechos del bosque de coihue-ulmo, que es uno de los más intervenidos del sur de Chile. Un alto riesgo en este sentido, presentan las familias *Hymenophyllaceae* y *Polypodiaceae*, que no pueden prosperar fuera del bosque (Godoy *et al.*, 1981).

2.2 Clasificación botánica de los helechos.

La clasificación de los helechos ha sufrido cambios en los últimos cincuenta años, según Naour (2004), en el año 1964 Hill en el Tratado de Botánica propuso que los helechos pertenecen a la División Tracheophyta, Subdivisión Pteridopsida, Clase Filicinae; luego en el año 1993, Strasburguer, propone que los helechos se ubican en la escala evolutiva entre los musgos y las plantas con semillas y pertenecen a la División Pteridophyta.

Según Rodríguez., *et al.* (2009), los helechos pertenecen a la División Pteridophyta, un grupo primitivo de plantas vasculares que existen hace más de 400 millones de años. Por lo tanto muchos de sus representantes están extinguidos y solo un grupo de pteridophytos que son los más evolucionados son los que poseen la mayoría de especies actuales, siendo abundantes en los bosques tropicales y regiones húmedas del planeta, estos se agrupan con el nombre de Clase Filicopsida o Helechos.

2.3 Distribución geográfica de los helechos.

Debido a su origen arcaico, la distribución actual de los helechos además de estar condicionada por su capacidad de adaptación a los distintos ambientes donde se desarrollan, presenta una fuerte influencia de los diferentes acontecimientos geológicos que han sufrido los diversos territorios (Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao, 2001).

La mayoría de los helechos se encuentran en climas tropicales y las especies van disminuyendo gradualmente a medida que se avanza hacia el sur: sin embargo, la presencia de estas plantas vasculares en el territorio austral posee un gran interés florístico por su origen y vinculaciones con otras regiones del planeta (Palmengarten, 1992).

En un intento de explicar la presencia de los Pteridophytos chilenos y su probable origen en el territorio austral de América del Sur, se ha adaptado el modelo de Barbera y Willink, que con algunas modificaciones, permite dar una visión global de la situación de estas plantas y su estado de conservación (Rodríguez, 1989a).

2.4 Distribución de Helechos en Chile.

La flora pteridophyta reconocida en el país, de acuerdo con las leyes de nomenclatura botánica alcanzan a unas 150 especies, lo que constituye un 3% del total de las plantas que forman la flora vascular de Chile (Gunckel, 1984).

Según estudios realizados, para el total de pteridophytos representados en Chile continental e islas oceánicas adyacentes se obtuvieron seis áreas geográficas, de acuerdo a su similitud florística; 1) Chile territorio continental que comprende tres zonas: Zona Norte: desde los 17° 57' hasta los 27° 59' S, Zona Central: desde los 28° 0' hasta los 37° 59' S y Zona Sur: desde los 38° 00' hasta los 55° 59' S. 2) Chile Islas Oceánicas que comprende; Isla de Pascua: 27° 12' S y 109° 26'

W, Juan Fernández: 30°45' S y 80° 46' W e Isla Mocha: 38° 19'S y 73° 55' W. Además, para estas zonas se consideró un total de 160 especies, distribuidas en 51 géneros y 22 familia (Godoy, 1989).

Cuadro 1. Espectro biológico de la flora pteridofítica de Chile Continental e Islas Oceánicas, se indica el número absoluto de las especies consideradas en el análisis de acuerdo Godoy 1989. Entre paréntesis van los números porcentuales.

Forma de vida	Chile continental			Chile Islas Oceánicas		
	Norte N° (%)	Central N° (%)	Sur N° (%)	I. Pascua N° (%)	J. Fernández N° (%)	I. Mocha N° (%)
Epifitos	1(4,0)	11 (17,5)	26 (28,9)	0 (0,0)	24 (40,0)	14(36,8)
Fanerófitos	0 (0,0)	3 (4,8)	3 (3,3)	0 (0,0)	9 (15,0)	2 (5,3)
Caméfitos	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (6,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
Hemicriptófitos	22(88,0)	40(63,5)	51(56,6)	12(75,0)	25(45,1)	20(52,0)
Geófitos	0 (0,0)	2 (3,1)	5 (5,6)	2 (12, 5)	2 (3,3)	0 (0,0)
Helófitos	1 (4,0)	2 (3,1)	2 (2,2)	1 (6,2)	0 (0,0)	1 (2,6)
Hodrófitos	1 (4,0)	5 (8,0)	3 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,6)
Total especies	25	63	90	16	60	38

Fuente: Godoy (1989). Espectro biológico de la flora pteridofítica de Chile continental e insular.

2.4.1 Distribución de los helechos en el sur de Chile.

Se extiende sobre montañas y valles desde el Sur del río Bío- Bío hasta Tierra del Fuego; aquí el clima es húmedo, hay lluvias todo el año y en algunas zonas alcanza los 5000 mm (Rodríguez, 1989a). En esta zona se encuentran en forma característica especies de amplia distribución, como: *Shizaea fistulosa* Labill, *Pleopeltis macrocarpa* y *Lophosoria quedripinnata*, (Palmengarten1992). Este último presenta como característica ser un helecho de crecimiento arbustivo el cual se utiliza como ornamental, llegando a medir aproximadamente 3 metros (Rodríguez, 1989a).

El aporte más grande de helechos para el área continental de Chile se encuentra aquí alcanzando casi el 80% total registrado en este territorio. Es notable la presencia de familias con la mayoría o todos sus representantes chilenos en esta zona, como los casos de *Aspleniaceae* (5 especies), *Blechnaceae* (10 especies), *Dryopteridaceae* (15 especies), *Gleicheniaceae* (4 especies), *Hymenophyllaceae* (23 especies), *Lycopodiaceae* (7 especies), *Ophioglossaceae* (6 especies), *Polypodiaceae* (6 especies) y *Pteridaceae* (7 especies). Además de *Azolla filiculoides* que vive en charcos o esteros con poca corriente (Palmengarten, 1992).

2.5 Ciclo de vida de los helechos.

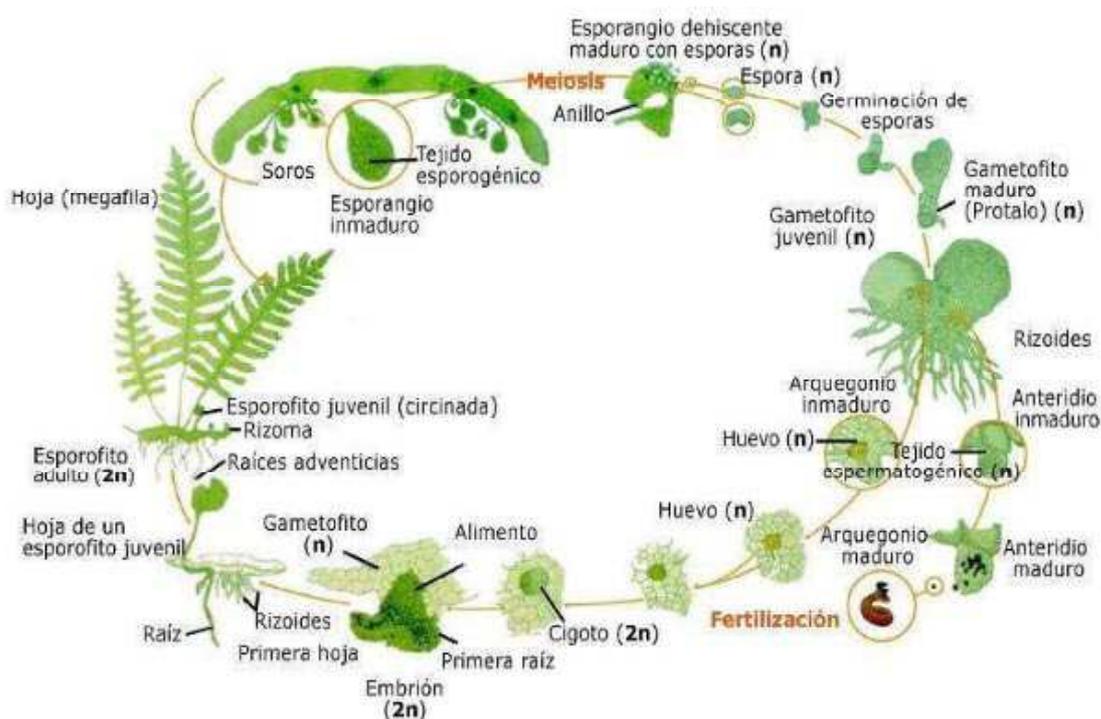


Figura 1. Ciclo de vida de los Pteridophytes (Rodríguez, 2002).

Los helechos se reproducen por esporas y en su ciclo reproductivo se presentan dos estadios o generaciones separadas. Una de ellas es asexual o esporofítica, en la cual la planta tiene raíces,

tallos y hojas (frondas). La otra es la generación sexual o gametofítica, en la cual la planta es pequeña y se le llama prótalo. El ciclo de vida de los helechos puede parecer complicado pero ha funcionado con bastante éxito por millones de años. Aunque las esporas vienen de las frondas de helechos, las frondas no vienen directamente de estas estructuras reproductivas (Rodríguez, 2002).

Las esporas al ser liberadas caen al medio donde encontrarán humedad y luz y, germinarán dando lugar a un órgano llamado prótalo el cual es una lamina verde pluricelular con forma de corazón. Este no tiene hojas ni tallos, ni vasos ni raíces verdaderas sino simplemente algunos pelos absorbentes llamados rizoides que proporcionan los nutrientes y agua (Rosales, 2005).

En la cara inferior del prótalo se diferencian los órganos reproductores, anteridios para el órgano masculino y arquegonios para el órgano femenino. Cuando alcanzan su madurez, los anteridios liberan los anterozoides (gameto masculino) provistos de flagelos que les permitirán su desplazamiento. Los anterozoides se encuentran por lo general en gran número, en cambio los arquegonios, menos numerosos, no encierran más que una sola célula, la oosfera o gameto femenino (Rodríguez, 2002).

Para que pueda realizarse la fecundación será necesario que el prótalo se encuentre en ambiente húmedo. Los anterozoides se van a desplazar sobre una fina película de agua en la superficie del prótalo gracias a sus flagelos. El anterozoide penetra entonces en el arquegonio y se fusiona con la oosfera para dar como resultado un solo huevo. Es posible la fecundación de varias oosferas pero cada prótalo no desarrollará más que un solo huevo. Este huevo germinará sobre el prótalo, desarrollará una raíz primaria y una primera fronda y después, a medida que crezca la nueva plántula, el prótalo desaparecerá progresivamente (Rodríguez, 2002).

Según Rosales (2005), el cigoto o huevo formado marca el inicio de la generación esporofítica y es retenido dentro del arquegonio donde se desarrolla, el cual forma primero el embrión y después un nuevo esporofito con raíces, tallos y hojas. Durante el proceso de desarrollo

embrionario hasta la aparición de las primeras raíces y hojas, el esporofito recién formado depende de la nutrición del diminuto gametofito.

Hay helechos que pueden producir todas sus esporas iguales, y son capaces de formar anteridios y arquegonios, en cambio hay otros que producen dos clases de esporas: las macrosporas, de mayor tamaño que dan lugar a prótalos femeninos, es decir, sólo con arquegonios, y las microsporas, más pequeñas que producen prótalos masculinos, o sea, con anteridios. Los primeros son Pteridofitos isospóreos y los segundos heterospóreos (Rodríguez, 2002).

2.6 Morfología de los helechos.

2.6.1 Raíz. Las raíces, por lo general están esparcidas especialmente cuando el tallo es un rizoma, pero en la mayoría de los casos se desarrollan en la parte inferior del tallo, desempeñando las funciones de fijación y absorción de sustancias nutritivas (Gunckel, 1984).

A diferencia de los tallos, las raíces de los helechos son relativamente uniformes y sencillas. La epidermis radicular tiene una pared delgada y puede o no presentar pelos radicales. La corteza en general contiene células esclerenquimatosas de paredes gruesas, y hay una endodermis bien definida (Jensen y Salisbury, 1988).

2.6.2 Tallo. El tallo es casi siempre un rizoma subterráneo o rastrero; algunas veces erguido, oblicuo o aún trepador. Alcanza el carácter de un eje principal en el que se distinguen haces fibro-vasculares, generalmente poco ramificados, tomando la dirección, de acuerdo a la inserción de las hojas; muchos tallos toman la dirección horizontal formando rizomas, pero otros se elevan considerablemente, dándole a la planta un aspecto elegante y vistoso, y a veces de talla notable (Levet, 2003).

2.6.3 Hojas. Las hojas de Pteridofitos generalmente son grandes y compuestas, y se denominan frondas o frondes. Como una demostración de su primitiva naturaleza caulinar se presentan

inicialmente arrolladas en forma de cayado o brazo de violín (prefoliación circinada) y a veces con un crecimiento apical de larga duración (Carrillo, 2000). Las frondas en su estado adulto pueden ser simples, lobuladas, pinnadas, bipinadas o mas, esto va a depender al grado de división que presente la lamina, además puede presentar otras formas de división y adherencia que identificarán su arquitectura (Rodríguez, *et al.*, 2009).

Las frondas están formadas por un estípote semejante a un tallo, y una lámina. Las láminas se pueden dividir en pinnas las que, a su vez, se pueden fraccionar de diversas formas (Carrillo, 2000).

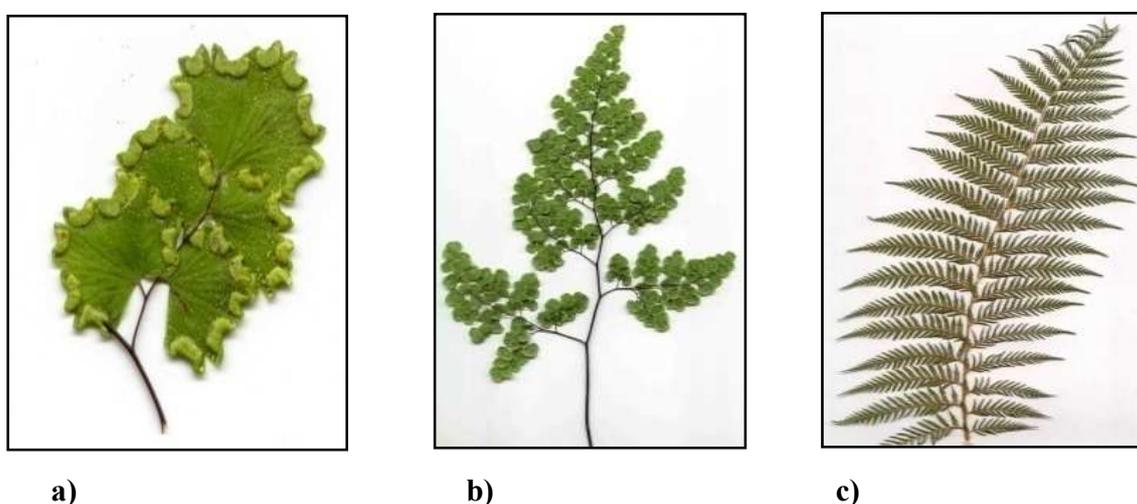


Figura 2. Diversas frondas de Pteridophytos a) *Adiantum sulphureum*, b) *Adiantum chilense* y c) *Lophosoria quadripinnata*.

2.6.4 Esporangio. Los esporangios son las estructuras reproductivas de los helechos. Son cápsulas o sacos que producen las esporas. Los esporangios se encuentran en la superficie inferior de las frondas o en algunos casos en las axilas de estas, (Rodríguez, *et al.*, 2009).

Al enfocar con un microscopio, observaremos que los esporangios consisten en cientos de pequeños globitos cada uno circundado por una banda gruesa y segmentada (anillo) que se desprende y libera a las esporas (Ramírez *et al.*, 2000)

Estas estructuras se encuentran frecuentemente reunidos en grupos llamados soros, que suelen estar protegidos por un repliegue llamado indusio (Carrillo, 2000).

2.6.5 Esporas. Las esporas son estructuras de resistencia que se encuentran en el envés de las frondas, representan la forma de reproducción sexual de las especies y a la vez son la forma de dispersión más efectivas por el viento, debido al tamaño microscópico y forma aerodinámica que presentan. Estas, se aprecian a simple vista como un polvo fino que se forma en el interior de estructuras especializadas llamadas esporangios, los cuales, se localizan en la mayoría de las especies en el envés de la fronda (Ramírez *et al.* 2000).

Las esporas se forman de células madres que proceden del tejido esporógeno del anterior del esporangio; cada célula madre que es diploide como todo el esporofito, se divide ecuatorial y reduccionalmente, originando cuatro células haploides que son otras tantas esporas que al abrirse los esporangios salen al exterior. En condiciones favorables de temperatura y humedad “germinan” para producir el prótalo, una placa de células plana, verde, con pequeñas estructuras semejantes a raíces denominadas rizoides (Carrillo, 2000).

La espora es la célula reproductiva asexual de un helecho, esta se produce a través del proceso de división celular (meiosis) que ocurre en el interior del esporangio, a partir de 16 células madres diploides ($2n$) que a través del proceso de división dará lugar a 4 células hijas haploides (n) (Moran, 2004).



Figura 3. Esporangio con esporas de *Adiantum chilense*.

2.7 Conservación de los helechos en Chile.

En Chile, la disminución del bosque nativo tiene complejas causas sociales y económicas, la habilitación de extensas superficies de territorio para diversos fines económicos ha sido la causa de simplificación, degradación y en muchos casos la desaparición de los diversos ecosistemas vegetales boscosos. además, el deficiente manejo que hoy en día sufren principalmente los bosques del sur de Chile, influye directamente en la conservación, ya que la sobreexplotación a la cual se ven expuestos pueden ocasionar en un periodo corto de tiempo cambios importantes en la composición y estructura del ecosistema natural (Donoso y Lara, 1999)).

Hoy en día, los bosques de *Nothofagus obliqua* (roble), corresponden a uno de los ecosistemas vegetales que presentan un mayor impacto causados por el hombre, son característicos del Valle Central y a través de los años han sido explotados de manera indiscriminada, encontrándose solo remanentes de estos ecosistemas originales, provocando así la pérdida de biodiversidad (Donoso, 1994).

La flora pteridophytica presenta problemas de conservación, ya que el hábitat natural ha sido alterado constantemente a través de los años provocando un riesgo de extinción sobre algunas especies. Uno de los factores de mayor importancia que provoca este desequilibrio en algunas especies se debe a la intervención antrópica, producto de la sobreexplotación que sufren los bosques como es el caso particular de los asociación boscosa Coigue-Ulmo y Olivillo en el sur de Chile, el cual sirve de hábitat para las familias *Hymenophyllaceae* y *Polipodiaceae* (Godoy *et al.*, 1981).

La reducida área de distribución de los helechos endémicos, es unos de los factores que pone en peligro la supervivencia de este tipo de especies, ya que algunas de estas se limitan a zonas de alta fragilidad para su conservación (Carrillo, 2000).

Las características ornamentales que exhiben muchos de ellos han llevado a que exista un alto interés comercial por estas especies, provocando un incremento en su extracción y deterioro de

sus ecosistemas naturales. Lo anterior se ha visto incrementado por el continuo reemplazo de bosques nativos por especies exóticas de rápido crecimiento, en cuyo ambiente no se pueden desarrollar los helechos, ya sean, geófitos como epífitos (Rodríguez, 2002).

La importancia en la conservación de los helechos al igual que otras especies vegetales que se encuentran en el sotobosque es que contribuyen a la captación y aporte de humedad, materia orgánica, nichos para la microfauna y fauna y sirven de materia prima vegetal y animal a los pobladores de las zonas aledañas donde se encuentran estas especies (Paz, 2007).

2.8 Descripción de helechos a evaluar.

2.8.1 Familia: *Adiantaceae*

2.8.1.1 *Adiantum chilense* Kaulf. (Nombre común: Helecho palito negro, Culantrillo). Hierba perenne con rizoma rastrero, de 2 mm de diámetro. Hojas de 15 a 40 cms de largo. Pecíolo de 1 mm de diámetro, color café negruzco. Soros marginales, algo alargados, de 1 a 3 mm de largo, protegidos por el indusio originado por el margen del segmento, que posee una escotadura hemisférica central (Gunckel, 1984; Rodríguez *et al.*, 2009).

Nativo de Chile y Argentina, en el país crece desde la provincia del Limarí hasta Magallanes, desde los 1700 m.s.n.m. además se encuentra en la isla de Juan Fernández, se puede encontrar en el margen y dentro del bosque, e incluso en terrenos expuestos al sol, pero siempre donde exista agua disponible para sus raíces (Rodríguez *et al.*, 2009).

En medicina popular las frondas se utiliza en decocción con miel de abejas y se administra como pectoral, aperitivo y emenagogo. Además se usa como planta ornamental de interior y jardines (Rodríguez *et al.*, 2009).

Estado de conservación: Fuera de peligro (Baeza *et al.*, 1998)

2.8.1.2 *Adiantum sulphureum* Kaulf. (Nombre común: Doradilla). Hierba perenne con un rizoma corto que lleva escamas de color castaño claro. Hojas de 4 a 34 cm de largo, peciolo delgados, lisos, quebradizos, de cerca de la mitad del largo total de la hoja, ligeramente escamosos en la base, lamina oblonga a oval-lanceolada, bipinnada a tripinnada. Últimos segmentos peciolulados de 0,5 a 1,5 por 0,5 a 2,6 cm, borde superior lobulado, glabros en la cara superior, con pequeños cuerpos amarillo adheridos directamente a la superficie de la cara inferior, sin pelos. Soros ubicados en los senos de los lóbulos protegidos por el indusio reniforme a alargado, originado por el margen del segmento.

Nativo de Chile y Argentina, en el país crece desde la provincia de Limarí hasta la provincia de Aisén, desde los 1700 metros de altitud en la cordillera andina (Rodríguez *et al.*, 2009).

Estado de conservación: Fuera de peligro (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.8.2 Familia Blechnaceae

2.8.2.1 *Blechnum chilense* (Kaulf.) Mett. (Costilla de vaca, quilquil). Subarbusto perenne con rizoma erecto, escamoso, de 3 a 5 cm de diámetro, en ejemplares grandes puede formar un pequeño tronco de 50 cm de alto por 15 cm de diámetro. Hojas dimorfas, las estériles de 0,5 a 1,5 m de largo por 10 a 40 cm de ancho, peciolo de 20 a 40 cm de largo, algo leñoso, en la base con escamas anchas, de color castaño claro, lamina pinnada, de contorno oval-lanceolado, pinnas de 5 a 20 cm de largo por 1 a 3 cm de ancho, agudas, brevemente pecioluladas, base cordada, hojas fértiles algo más largas que las estériles, con pinnas de 3 a 10 mm de ancho, dirigidas hacia el ápice. Soros cubriendo íntegramente la cara abaxial, indusio submarginal, continuo (Gunckel, 1984; Rodríguez *et al.*, 2009).

Especie nativa de Chile y Argentina, en el país su distribución va desde la costa de la provincia de Limarí y región andina de la provincia de Santiago hasta la provincia de Magallanes. También habita en Juan Fernández, es un helecho de lugares muy húmedos, a lo largo de los cursos de agua y es característico en pantanos formando asociaciones con *Gunnera tinctoria* (pangue). Se

encuentra en mayor proporción al interior del bosque, especialmente en quebradas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Especie que se utiliza como ornamental en jardinería, requiere altos niveles de humedad y aire libre. Antiguamente el pueblo mapuche utilizaba los rizomas como alimento (rico en fécula), también lo empleaban en medicina casera para curar enfermedades a la vista (Gunckel, 1984).

Estado de conservación: Fuera de peligro (Baeza *et al.*, 1998)

2.8.2.2 *Blechnum hastatum* Kaulf. (Nombre común: Arriquilquil, palmilla). Especie perenne con rizoma erecto, o lago oblicuo o escamoso. Hojas pinnadas, monomorfas, generalmente de 10 a 70 cm de largo, peciolo de 3 a 25 cm de largo, con escamas en la base, laminas subherbacea a coriácea, de contorno oval-lanceolado, ápice alargado y agudo, base ancha, truncada hasta aflechada, raquis con pelos dispersos con la base mas o menos auriculada, unidas al raquis por un peciolulo breve, pinnas apicales gradualmente adnadas al raquis. Soros en cenoros submarginales, que ocupan tres cuartos o más del largo de la pinna, con frecuencia interrumpidos, indusio papiráceo, lateral, blanquecino, algo lacerado (Rodríguez *et al.*, 2009).

Especie nativa de Chile y Argentina, en el país crece desde Fray Jorge (provincia de Limarí) hasta la provincia de Chiloé, se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2.500 m de altitud en la cordillera de los Andes. Además se encuentra en Juan Fernández. Crece en lugares abiertos, bajo arbustos, en vegetación de vertientes o corrientes de agua. Es la especie del género en Chile que exige menos humedad (Gunckel, 1984; Rodríguez *et al.*, 2009).

Se ha usado frecuentemente en medicina popular como abortivo y vomitivo (Gunckel, 1984).

Estado de conservación: Fuera de peligro (Baeza *et al.*, 1998).

2.8.3 Familia *Dicksoniaceae*

2.8.3.1 *Lophosoria quadripinnata* (J.F. Gmel.) C. Chr. (Nombre común: Ampe, palmilla). Helecho perenne con rizoma grueso, cubierto de pelos largos. Hojas numerosas, de hasta 5 m de

largo, peciolo gruesos, leñosos, de 0,5 a 2 m de largo por 2 cm de diámetro, surcados por encima y redondeados por abajo, cubiertos por largos pelos rojizos cuando jóvenes, algo glabros cuando adultos, lamina tripinnada a cuatripinnada, de 2 a 3 m de largo, la cara superior de color verde oscuro y brillante, glabra, cara inferior glauca a blanquecina, con pelos lanuginosos castaño claros, pinnas lanceoladas, con la base ancha paeoluladas, de 20 a 60 cm de largo, últimos segmentos denticulados, con el borde algo reflejo. Soros arcuados, de 1 mm de diámetro, sin indusio, solo protegidos por pelos pluricelulares ferrugíneos (Rodríguez *et al.*, 2009).

Helecho de amplia distribución a nivel sudamericano. En el país se encuentra desde la Región del Maule hasta la región de Aisén, además del Archipiélago de Juan Fernández, desde cerca del nivel del mar hasta 2.000 de altitud. Es una planta que exige considerable humedad, dentro del bosque sombrío y asocia a otras plantas higrófilas (Rodríguez *et al.*, 2009).

Se utiliza principalmente como especie ornamental en jardines y como hojas cortadas para florería. Sus rizomas se emplean en forma de infusión para curar heridas y aun como hemostático (Gunckel, 1984; Rodríguez *et al.*, 2009).

Estado de conservación: Vulnerable (Rodríguez *et al.*, 2009).

2.8.4 Familia Dryopteridaceae

2.8.4.1 *Rumohra adiantiformis* (G. Forster) Ching (helecho cuero). Hierba perenne con rizoma largamente rastrero, carnoso, grueso, de 2 a 11 mm de diámetro, densamente escamoso. Hojas coriáceas, de 30 a 65 cm de largo; peciolo separados, acanalados, de 2, 5 a 40 cm de largo, con escamas de color castaño claro cerca de la base, lamina tripinnada, deltoide, lanceolada a anchamente aovada, raquis y raquillas acanalados, más o menos cubiertos de escamas pequeñas, castaño claras, 7 a 15 pares de pinnas paeoluladas, alternas, lanceolado-deltoides a aovado-deltoides, últimos segmentos sésiles, decurrentes en el raquis, glabros, alternos oblongo-lanceolados, distantes, apice obtuso, algunas veces agudo, margen con dientes crenados. Soros de posición mediana, orbiculares, indusio persistente, peltado, con el centro oscuro (Gunckel, 1984; Rodríguez *et al.*, 2009).

Esta especie habita en Australia, Polinesia, Nueva Zelanda, África austral y en América austral. En el país su distribución va desde la provincia del Limarí, Cautín al sur, hasta la provincia Antártica Chilena, comúnmente a orillas de matorrales y bosques entre 15 a 1.200 de altitud (Gunckel, 1984).

Especie con importancia ornamental utilizado en jardines, se reproduce vegetativamente a través de la fragmentación del rizoma (Rodríguez, *et al.*, 2009).

Estado de conservación: Fuera de peligro (Baeza *et al.*, 1998)

2.9 Utilización e importancia económica de los helechos.

Los pteridofitos, con mucha frecuencia se utilizan como ornato en parques y jardines, en arreglos florales, en medicina tradicional y otras más como soportes de orquídeas y de otras plantas epifitas. También son importantes desde el punto de vista paleobotánico, ya que debido a la resistencia que presentan las esporas a los factores ambientales se encuentran desde el paleozoico hasta el presente permitiendo determinar el tipo de flora que existió en las épocas geológicas pasadas y a su vez correlacionarlas con la flora actual (Sánchez *et al.*, 2008)

Carrillo (2000), señala que varios helechos se pueden cultivar muy bien en jardines, entre los que figuran algunas especies nativas como *Adiantum chilense*, *Adiantum excisum*, *Blechnum chilense*, *B. arcuatum*, *B. magellanica*, *B. auriculatum* y *Dennstaedtia glauca*. Ellos se ven ocasionalmente en jardines y parque de Chile, pero todavía no han alcanzado el valor ornamental que merecen. Fuera de éstos, son numerosos los pteridofitos naturalizados que se cultivan entre los que se cuentan especies del género *Adiantum* (*A. capillus-veneris*, *A. pedatum*) y *Lophosoria quadripinnata*, helecho muy hermoso con grandes hojas divididas las que se utilizan para diversos fines, lo que lo convierte en una especie muy apta para sitios poco iluminados.

La demanda de plantas, que se ha incrementado en los últimos años, depende del uso que se le otorgue a cada individuo, influyendo las características ornamentales que presenten, tales como la morfología y el atractivo que tenga la fronda (Levet, 2003).

2.9.1 Antecedentes de mercado interno para helechos. De acuerdo a un sondeo de mercado realizado en la Región Metropolitana, se estima que del total de especies provenientes del sur que se comercializa en los viveros de Santiago, un 12,4% corresponden a helechos y su presencia en los jardines llega a un 16,7% del total de las especies (Rodríguez, 2002). Las principales plantas ornamentales recolectadas en San Juan de la Costa y vendidas en Osorno, son varias especies de *Lycopodium*, *Equisetum*, helechos de los géneros *Blechnum*, *Dricranopteris* y frondas de la especie *Lophosoria quadripinnata* (Levet, 2003).

Según estudios (FIA 2008), el mercado interno es el más importante, donde se utiliza principalmente para la elaboración de arreglos florales. El producto comercializado es el follaje que proviene de la recolección en zonas rurales del país entre las regiones del Maule y Los Lagos. El precio de comercialización del recolector, se establece de acuerdo a la calidad de rama colectada, lo que genera por su variabilidad una disminución en el rendimiento y precios muy bajos. En el mercado mayorista los precios aumentan considerablemente de sur a norte pudiendo costar en Santiago el doble del valor que en la zona sur (FIA, 2008). Finalmente, la venta al detalle se realiza en viveros, grandes tiendas o sitios web y los precios son aún mayores y varían dependiendo de la especie y tamaño de cada una (FIA, 2008).

2.9.2 Antecedentes de Mercado externo para helechos. Algunas especies que se extraen en el sur de Chile, estas son comercializadas a través de empresas que se abastecen por medio de acopiadores o intermediarios que compran en el mercado informal o bien al contratar recolectores a jornal (Tacón *et al.*, 2000). Las especies de mayor demanda según el atractivo de sus frondas corresponden a *Lophosoria quadripinnata* y plantas del género *Lycopodium* siendo Alemania el principal país de destino (Levet, 2003).

La comercialización de frondas, está orientada principalmente para ser utilizadas en arreglos florales. Los principales países importadores a través de los años han sido Holanda, Estados Unidos y Alemania. Además, en los últimos años Japón es uno de los países que ha ido creciendo en importaciones lo cual ha aumentado en un 70,2% respecto al año 2004. Generalmente las frondas de helechos se exportan en cajas cerradas, por especie de 500 unidades cada una. En este sentido Estados Unidos efectúa una inspección en el sitio de empaque, con el fin de verificar que el follaje debe estar libre de plagas y residuos de pesticidas, este análisis es realizado en el marco del convenio SAG-USDA (FIA, 2008).

CUADRO 2. A continuación se presenta un cuadro con los principales países importadores de follaje fresco desde Chile.

País	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Japón	10.395	0	4.767	2.747	108.822	334.502
Holanda	91.494	58.248	142.155	234.966	162.500	61.609
Estados Unidos	60.830	40.966	78.174	93.872	68.406	56.181
Alemania	35.688	11.018	19.353	8.983	10.052	7.064
España	0	0	0	2.820	0	2.400
Bélgica	5.496	12.772	4.644	792	5.256	724
Portugal	0	0	3.206	978	1.062	0
Suiza	9.714	6.504	4.588	1.248	448	0
Suecia	0	0	0	832	0	0
Francia	1.414	552	0	768	0	0
Reino Unido	4.512	408	1.064	504	0	0
Canadá	594	0	24.268	0	0	0
Argentina	4.995	0	0	0	0	0
Total	225.132	130.468	286.320	348.580	357.242	462.580

Fuente: Proyecto de Innovación Producción de Helechos Nativos, FIA 2008

2.10 Cultivo de helechos.

2.10.1 Uso de técnicas tradicionales. Los helechos con características ornamentales pueden desarrollarse en ambientes muy variados, desde este punto de vista, ha agrupado los helechos en: helechos para principiantes (de fácil cultivo), helechos para el sol, helechos para sombra, helechos para suelos secos, helechos para suelos bien húmedos, helechos para suelos ácidos y helechos para suelos alcalinos (Rodríguez, 2002).

Para el cultivo de helechos se recomienda extremar las medidas tendientes a evitar la contaminación ya que pueden ser atacados especialmente por hongos y algas debido a las condiciones de alta humedad y encierro en las cuales se desarrollan, por lo tanto, es importante esterilizar el suelo o sustrato en un microondas o horno de cocina por 30 a 120 minutos dependiendo de la temperatura y artefacto empleado. Del mismo modo las esporas y contenedores pueden ser desinfectados con una solución de cloro al 2% y luego ser enjuagados con agua destilada (Rodríguez, 2002).

Otro aspecto importante en el cultivo de helechos es la calidad del agua, esta debe ser lo más libre de sales posible. Factor muy relevante si pensamos sobre todo en especies nativas, las cuales son regadas en condiciones naturales básicamente por el agua de lluvias. Se recomienda el uso de agua destilada sobre todo en la primera fase del ciclo de los helechos (Rodríguez, 2002).

Macaya (2004) señala, que en Chile a pesar de existir viveristas o coleccionistas que se dedican al cultivo de helechos, hay una escasa o nula información accesible a profesionales o al público en general acerca de las técnicas que utilizan para una óptima propagación de estas especies.

2.10.2 Propagación por esporas. Baeza (2001), señala que previo a la siembra las esporas deban ser sumergidas en una solución desinfectante con hipoclorito de calcio o hipoclorito de sodio a distinta concentración, siendo la primera la más eficiente, utilizando una concentración al 2% dentro de un periodo de tiempo de 10 minutos.

Se recomienda para la propagación a través de esporas, utilizarlas en estado fresco, ya que investigaciones preliminares han comprobado la pérdida de viabilidad de las esporas con el almacenaje como es el caso de Beri y Bir (1995), quienes encontraron un retraso en la germinación de *Pteris vittata* para todos los tratamientos de almacenaje que iban desde 0 a 40°C por 10 días. De las esporas almacenadas, el tratamiento a 20°C resultó ser el mejor (Rodríguez, 2002).

Este método requiere de una instalación muy cuidadosa; suele llevarse a cabo por establecimientos especializados que venden plántulas de uno o dos repicados. A través de este método, las esporas se colectan de los esporangios maduros que están en el envés de la fronda las cuales tienen aspecto polvoriento (Levet, 2003).

La propagación mediante esporas, es importante la recolección del material vegetal en el momento oportuno, es decir, cosechar frondas fértiles, donde los soros (estructuras que se ubican en el envés de la fronda) tengan una coloración amarillo, café o verde oscuro. Una coloración verde indica que dichas estructuras aún están inmaduras (FIA, 2008).

2.10.2.1 Viabilidad de Esporas de Helechos. En la naturaleza una de las mayores dificultades que enfrentan las esporas cuando se incorporan al suelo es la conservación de la viabilidad, es decir la capacidad de permanecer vivas, y por lo tanto, germinar. Esta es una característica muy variable en los pteridófitos, la cual, depende no solo del tipo de espora, sino también de otras características fisiológicas como por ejemplo la edad, genotipo y la latencia, así como de factores ambientales que prevalecen en el suelo como: pH, Humedad, Temperatura, Luz, competidores y depredadores (Ramírez *et al.*, 2000).

Levet (2003), recomiendan almacenar las estructuras reproductivas de los helechos libres de esporangios en un medio aislado (frasco de vidrio), sin desecante, a temperatura ambiente y sin presencia de luz. Sin embargo el tiempo de almacenamiento va a depender del tipo de estructura que se trate, llegando en algunas especies (espora verde) a no más de dos días. En cambio en otro

tipo de especies la viabilidad de las esporas puede aumentarse al bajar la temperatura ambiente a unos 4°C (Aikins, 1997).

Las esporas verdes carecen de inactividad, el promedio de germinación es de 1,46 días de ser sembradas y tienen una viabilidad media de 48 días. Por otro lado, las no verdes germinan luego de 9,5 días promedio presentando una viabilidad media de 1045 días (Constantino *et al.*, 2000).

En Chile, actualmente no existen estudios que indiquen un método preciso de conservación de esporas de helechos en distintos medios sin que estas pierdan su viabilidad, a diferencia de lo que ocurre con diversos estudios con semillas (Carrillo, 2000).

2.10.3 Propagación por estolones. Existen algunos géneros de helechos como *Nephrolepis* que poseen yemas terminales que al entrar en contacto con el suelo, tienen la capacidad de generar hijuelos. Los estolones extraídos de las plantas madres son cultivados sobre bandejas en un sustrato en base a turba y mantillo de 30 cm de espesor, en el caso de corregir el pH se puede corregir añadiendo dolomita e hidróxido de cálcico (INFOAGRO, 2010).

2.10.4 Propagación por división de Rizomas. Consiste en seccionar el rizoma de la planta madre en su lugar de crecimiento natural con un cuchillo limpio, afilado o podadores para cortar divisiones, dejando en cada trozo de rizoma una fronda y cuantas raíces sea posible para luego ser desenterrada (Hartman y Kester, 1995).

2.10.5 Propagación Cultivo *in vitro*. La micropropagación de helechos se puede realizar a través de rizomas y esporas. Estas últimas son el método mayormente utilizado por la facilidad de colección y estar presente en gran número. Las esporas de varias especies, se pueden esterilizar y sembrar en agar nutriente. La germinación en sí de las esporas puede ser favorecida usando un medio libre de nutrientes, pero el crecimiento del prótalo mejora con la adición de sales inorgánicas y sucrosa (Rodríguez, 2002).

Rodríguez, *et al.* (2000), lograron hacer germinar esporas de *Adiantum chilense* en 14 días utilizando el cultivo *in vitro* de esporas con puentes de papel filtro, en un medio MS sin

hormonas, incubadas a 21°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y una intensidad luminosa de 1.000 lux. Así también, desarrollaron un sistema eficiente de aclimatación de las plantas que derivaban del cultivo *in vitro* al utilizar una cámara de agua destilada, oxigenada con difusores de aire. Mediante el sistema *in vitro* se pudo acortar el tiempo de germinación de las esporas y al mismo tiempo se logró un mayor crecimiento de los prótalos en comparación al sistema tradicional de cultivo.

2.10.6 Medios de Cultivos. Estos pueden variar dependiendo de la parte vegetal que se va a desarrollar para obtener un crecimiento óptimo del mismo. Básicamente los medios de cultivo están compuestos de macroelementos, microelementos, componentes orgánicos, vitaminas, aminoácidos y fuentes carbonadas (Levet, 2003). Esto coincide con lo que señala Rosales (2005), el cual menciona que un medio de cultivo en general está compuesto por; Sales Orgánicas, Vitaminas, Reguladores de Crecimientos, Aminoácidos, Carbohidratos, Agentes Solidificantes, Suplementos no definidos y Agua.

Rodríguez (2002) señala un programa para la producción comercial de *Platyserium superbum*. Para ello colectó esporas de plantas maduras durante el otoño, las esterilizó y las colocó sobre un medio Fossards modificado con una intensidad de luz de 1000 lux con un fotoperiodo de 16-h día y 25°C. Después de 3 meses las esporas germinaron y produjeron prótalos los que fueron subcultivados en intervalos de 2-3 meses deduciendo tejido gametofítico. De esto se produjeron un gran número de plantas esporofítica y ocurrió una proliferación de brotes directamente de los prótalos.

Las esporas de helechos pueden ser germinadas *in vitro*, si son colocadas en un medio semi-sólido, el cual contenga una baja cantidad de sales, y si son convenientemente sembradas al interior de tubos de ensayo largos. La composición exacta del medio para la germinación de esporas se recomienda que deba contener una baja concentración de iones (Rosales, 2005).

2.11 Alginato.

2.11.1 Antecedentes generales de alginato. Los alginatos fueron descubiertos en 1880 e identificados como constituyentes importantes de las paredes celulares de algunas especies de algas cafés (*Phaeophyceae*), como *Laminaria*, *Ascophyllum*, y *Macrocystis*. Estudios posteriores realizados por E.C. Stanford encontró que la sustancia a la cual denominó alginato poseía propiedades importantes tales como; espesante, formador de geles y películas. A partir de esto propuso varias aplicaciones industriales aunque la producción a gran escala se desarrolló años posteriores (Arteaga *et al.*, 2005).

2.11.2 Composición y extracción de Alginato de calcio. El ácido algínico es un coloide natural que se extrae principalmente de algas pardas (principal constituyente de su pared celular), a las cuales pertenecen los géneros *Macrocystis*, *Fucus*, *Laminaria* y *Gracillaria* entre otras (Roumeau, 2001). Por otra parte, Roumeau (2001), señala que los alginatos son familias de copolímeros binarios ramificados, unidos por enlaces 1,4 – glicocídicos, y difieren entre sí por la composición monomérica y la estructura de bloque. El alginato está presente como sales de calcio, magnesio y sodio. La meta del proceso de extracción es obtener alginato de sodio seco en polvo. El objetivo del proceso de extracción de alginato a partir de las algas es convertir todas las sales de alginato a sales de sodio, disolverlas en agua y eliminar los residuos de alga por filtración (McHugh, 2003).

Este coloide se extrae utilizando carbonato sódico y es precipitado mediante tratamiento con ácido, para formar geles de estructura química. Comercialmente se encuentran dos tipos: refinada y para uso técnico; la primera a diferencia de la segunda está libre de celulosa, además de ser blanqueada y purificada (Roumeau, 2001).

2.11.3 Propiedades y usos de alginato. Los alginatos son ampliamente utilizados en una gran diversidad de industrias debido a sus propiedades funcionales para la elaboración de alimentos en conserva ya que poseen la característica de carecer de sabor y olor, una de sus propiedades más importantes es la de formar geles instantáneamente, a través de una reacción con sales de

calcio. La cobertura de gel actúa como un agente sacrificante, es decir, la humedad se pierde de la cobertura antes que el alimento se deshidrate significativamente. Son buenas barreras para el oxígeno, retardan la oxidación de los lípidos, mejora la textura, el sabor y disminuye el recuento microbiano en la superficie. Para el caso de alginatos algales, estos geles y otros productos derivados, son inocuos y pueden emplearse en productos comestibles, mientras que los alginatos microbianos, aun no han sido aprobados para el consumo humano (Arteaga *et al.*, 2005).

El alginato es el material más comúnmente usado para encapsular microorganismos, el inóculo resultante es usado para varios propósitos entre estos para la inmovilización de células y enzimas, la aplicación de agentes de control biológico y microherbicidas, biorremediación de las aguas, en la investigación de quimiotaxis bacteriana y el cultivo de hongos (Bashan, *et al.*, 2002).

Trabajos específicos con hongos ectomicorrícicos han probado la efectividad de este método, siendo hoy en día una buena alternativa de inoculación, presentando ventajas respecto a otros métodos, el cual permite dosificar la cantidad de inóculo a utilizar incurriendo en un menor costo y mejor aprovechamiento del micelio (Roumeau, 2001). Así mismo, otros ensayos obtuvieron buenos resultados aplicando esta técnica de inoculación, inclusive, mejorando la efectividad de inoculación en especies del género *Laccaria*, comparado a con el micelio producido en turba-vermiculita, en el sentido de que se pueden obtener niveles de infección comparables aplicando dosis de de inóculo inferiores (Pera *et al.*, 1998).

Roumeau (2001), señala que en un medio líquido y utilizando alginato de calcio los micelios pueden permanecer viables hasta por cinco meses, lo que se reduce a cuatro cuando son almacenados en seco, ambos casos a una temperatura de 4°C. Además, señala que al aumentar la temperatura a 7°C pueden alcanzar los seis meses.

Bashan y González (1998), documentaron la viabilidad de bacterias inmovilizadas en condiciones normales de temperatura en esferas de alginato después de 14 años, aún teniendo en cuenta que se pueda deber a sus propias características.

El alginato es ampliamente investigado para la eliminación de metales en disoluciones acuosas diluidas. Comercialmente existe en forma de polvo como alginato sódico y forma disoluciones viscosas al disolverse en agua. Generalmente se prepara en forma de alginato cálcico cuando es utilizado en la eliminación de metales (Díaz de Apodaca *et al.*, 2007).

2.11.4 Encapsulamiento de Células. El encapsulamiento es un método de inmovilización celular, el cual en la agricultura se han empleado biocapsulas de alginato para la inclusión de células bacterianas para el control biológico de agentes fitopatógenos (Ciampi *et al.*, 1997).

Según Gibbs, *et al.*, 1999. El encapsulamiento es la inclusión de materiales sólidos, líquidos y gaseosos en pequeñas capsulas la cual permite controlar la liberación de su contenido durante un tiempo prolongado, la forma de esta puede ser muy variada ya sea de membrana simple, esférica o irregular. Los pasos involucrados en la encapsulación son; formación de la pared alrededor del material, aseguramiento de que no exista fugas y asegurarse de que no existan materiales extraños.

El bioatrapamiento celular en esferas de alginato consiste en realizar una suspensión de estas, mezclarla con una solución de alginato de sodio y hacer caer la mezcla gota a gota en una solución que contenga cationes multivalentes, usualmente Ca^{2+} . Las gotas se transforman en esferas de forma inmediata, atrapando a las células en una matriz tridimensional de alginato iónicamente ligada. Actualmente esta biotecnología se utiliza en formulaciones para microorganismos benéficos para la agricultura (Ciampi, 2005).

Las células microbianas inmovilizadas son fáciles de producir, almacenar y manejar durante las operaciones industriales, el objetivo de esta es mantener las células atrapadas en una forma activa tanto como sea posible. Este método en general no busca la liberación prematura de los microorganismos de esta forma encapsulada. Las formulaciones para uso en agricultura tienen al menos dos objetivos, por una parte busca proteger de manera temporal a los microorganismos encapsulados de las condiciones ambientales del suelo y de la competencia microbiana y por otra, buscan liberarlos gradualmente de tal modo que colonicen eficientemente las raíces de las plantas (Bashan, *et al.*, 2002).

3 MATERIAL Y MÉTODO

3.1 MATERIALES

3.1.1 Lugar de estudio. La extracción de esporas, elaboración de esferas de alginato de calcio y siembra de esporas se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

3.1.2 Obtención de muestras en terreno. La colecta de esporas se realizó en distintas zonas de la región de La Araucanía, cada una correspondiente a ecosistemas boscosos naturales, donde existe un número importante de flora pteridophytica, estos lugares son: Cerro Adencul (camino Victoria – Traiguén), Predio Rucamanque y fundo Maquehue (Temuco), Parque Nacional Villarrica y Parque Nacional Conguillio.

3.1.3 Material vegetal. Las especies de helechos obtenidas en la toma de muestras fueron identificadas al momento de la extracción, utilizando métodos tradicionales de reconocimiento tales como morfología, tamaño, entre otras. Sin embargo para tener certeza de lo colectado se recurrió a la literatura.

Cuadro 3. Helechos nativos, nombre científico y común.

Nombre Científico	Nombre Común
<i>Adiantum chilense</i> Kaulf.	Palo negro, culantrillo
<i>Adiantum sulphureum</i> Kaulf.	Doradilla
<i>Rumhora adiantiformis</i> (G. Forster) Ching	Helecho cuero
<i>Lophosoria quadripinnata</i> (J. F. Gemelin) C. Chr.	Palmilla
<i>Blechnum chilense</i> (Kaulf). Mett.	Costilla de vaca, quil quil
<i>Blechnum hastatum</i> Kaulf	Arriquilquil

3.1.4 Materiales de Laboratorio y Terreno

Laboratorio	Terreno
<ul style="list-style-type: none"> • Tamiz (1000, 106, y 35 micrones) • Vaso precipitado • Pinzas • Pipeta 10ml. • Matraz aforado • Papel oficio • Papel de aluminio • Etiquetas adhesiva para rotular • Agua destilada • Cámaras de germinación • Bandejas plásticas (8 * 20 * 2 cms con tapa) • Sustrato (tierra de hojas y humus) • Alginato de Sodio • Cloruro de Calcio • Papel milimetrado 	<ul style="list-style-type: none"> • Bolsas plásticas y papel • Etiqueta adhesivas • Lápiz (pasta, grafito, plumones) • Agenda de registro • Tijeras, corta cartón.

3.1.5 Equipos

<ul style="list-style-type: none"> • Lupa estereoscópica • Microscopio óptico • Pesa electrónica • Bomba peristáltica • Cámaras fotográficas (NIKON Coolpix 3700, CANON Power Shot, SX210 IS) • GPS (Garmin) 	<ul style="list-style-type: none"> • Refrigerador • Estufa eléctrica • Notebook HP Pavilion • Calculadora Casio fx-350 MS
--	---

3.2 METODOS

3.2.1 Elección días de muestreos. La programación de colecta del material vegetal se realizó de acuerdo a pronósticos de diversas instituciones meteorológicas a través de las páginas web, esto para tener certeza de visitar y coleccionar en un día con ausencia de lluvias y una temperatura adecuada, lo cual permitiera la correcta extracción del material vegetal y de esta manera evitar riesgos de contaminación y deterioro de la muestra.

3.2.2 Colecta de material vegetal. El material vegetal corresponde a frondas colectadas entre los meses de Marzo y Mayo. El criterio de colecta fue observar aquellas que en su envés poseían soros maduros, en general de color café.

Cuadro 4. Localidad de colecta de las distintas especies de helechos.

Nombre científico	Nombre común	Fecha de colecta	Lugar de muestreo
<i>Belchnum chilense</i> Kaulf. Mett.	Costilla de vaca	06/04/2010	* P. N. V.
<i>Adiantum chilense</i> Kaulf.	Palo negro	14/04/2010	Rucamanque
<i>Belchnum chilense</i> Kaulf. Mett.	Costilla de vaca	14/04/2010	Rucamanque
<i>Lophosoria quadripinnata</i> (J. F. Gemelin) C. Chr.	Palmilla, Ampe	24/05/2010	Rucamanque
<i>Rumhora adiantiformis</i> (G. Forster) Ching	Helecho Cuero	27/05/2010	* P. N. C.
<i>Adiantum sulphureum</i> Kaulf.	Doradilla	25/05/2010	Adencul
<i>Blechnum hastatum</i> Kaulf.	Arriquilquil	23/04/2010	Maquehue

* P.N.V.: Parque Nacional Villarrica; P.N.C.: Parque Nacional Conguillio.

3.2.3 Criterio de selección de frondas. La selección de frondas para las distintas especies de helechos se llevó a cabo de acuerdo a la morfología y madurez de los esporangios, siendo en algunas especies cortadas desde la base a ras de suelo con parte del peciolo y en otras cortando solo una parte de la fronda, sin la necesidad de extraer junto al peciolo. Las frondas extraídas,

fueron depositadas en bolsas de papel para favorecer el secado y evitar la humedad al momento de la colecta, al mismo tiempo las bolsas se rotularon con el nombre de la especie, lugar de colecta y fecha de extracción, para finalmente llevarlas al laboratorio y esperar alrededor de 10 días para el desprendimiento de las esporas.

3.2.4 Obtención de esporas. Se utilizaron tamiz (de 1000, 105 y 35 micrones) para obtener esporas libres de restos vegetales y demás impurezas. Luego se almacenaron en frascos de vidrio y plástico, cada una rotulada con el nombre de la especie a la cual pertenece. Estas se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente hasta el inicio del ensayo.

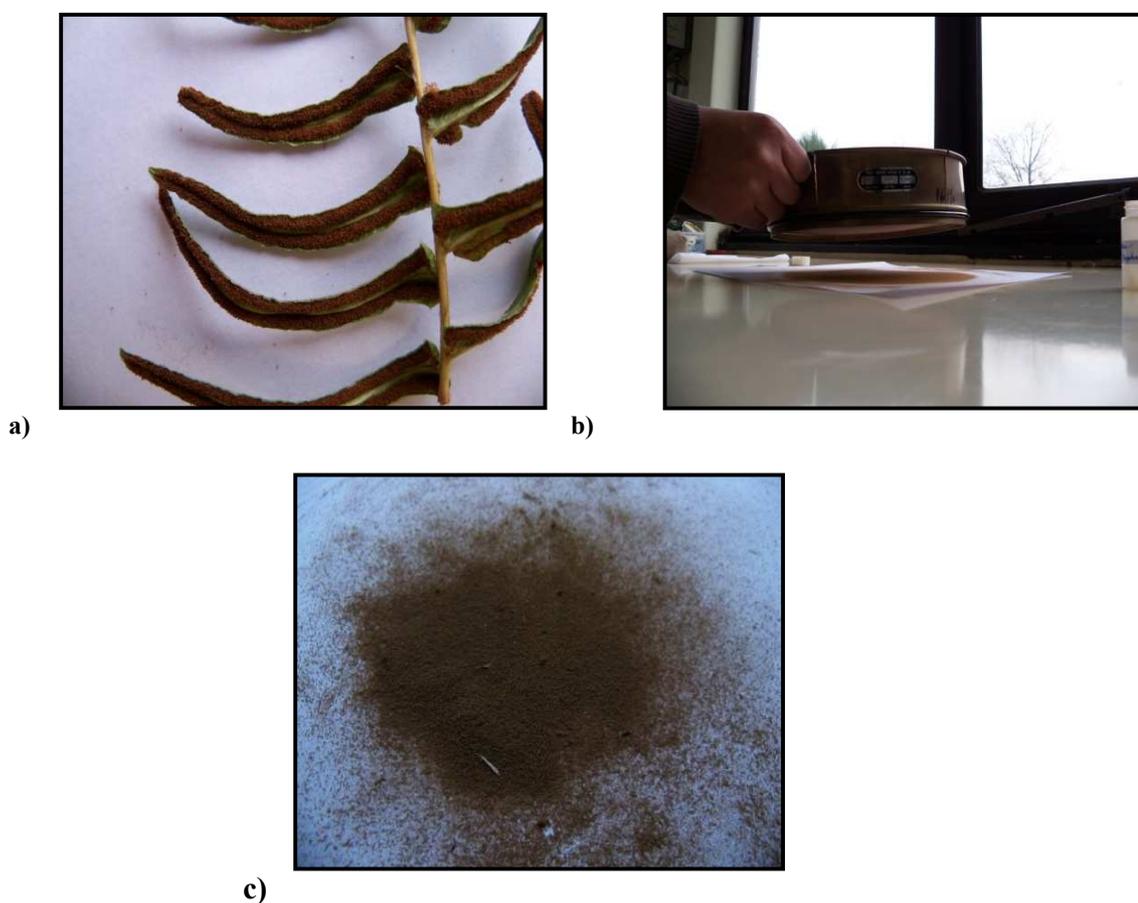


Figura 4. Proceso de obtención de esporas. a) Fronda fértil *Blechnum hastatum* con esporangios maduros, b) Tamiz 105 micrones para obtención de esporas y c) Esporas de helecho *Blechnum hastatum*.

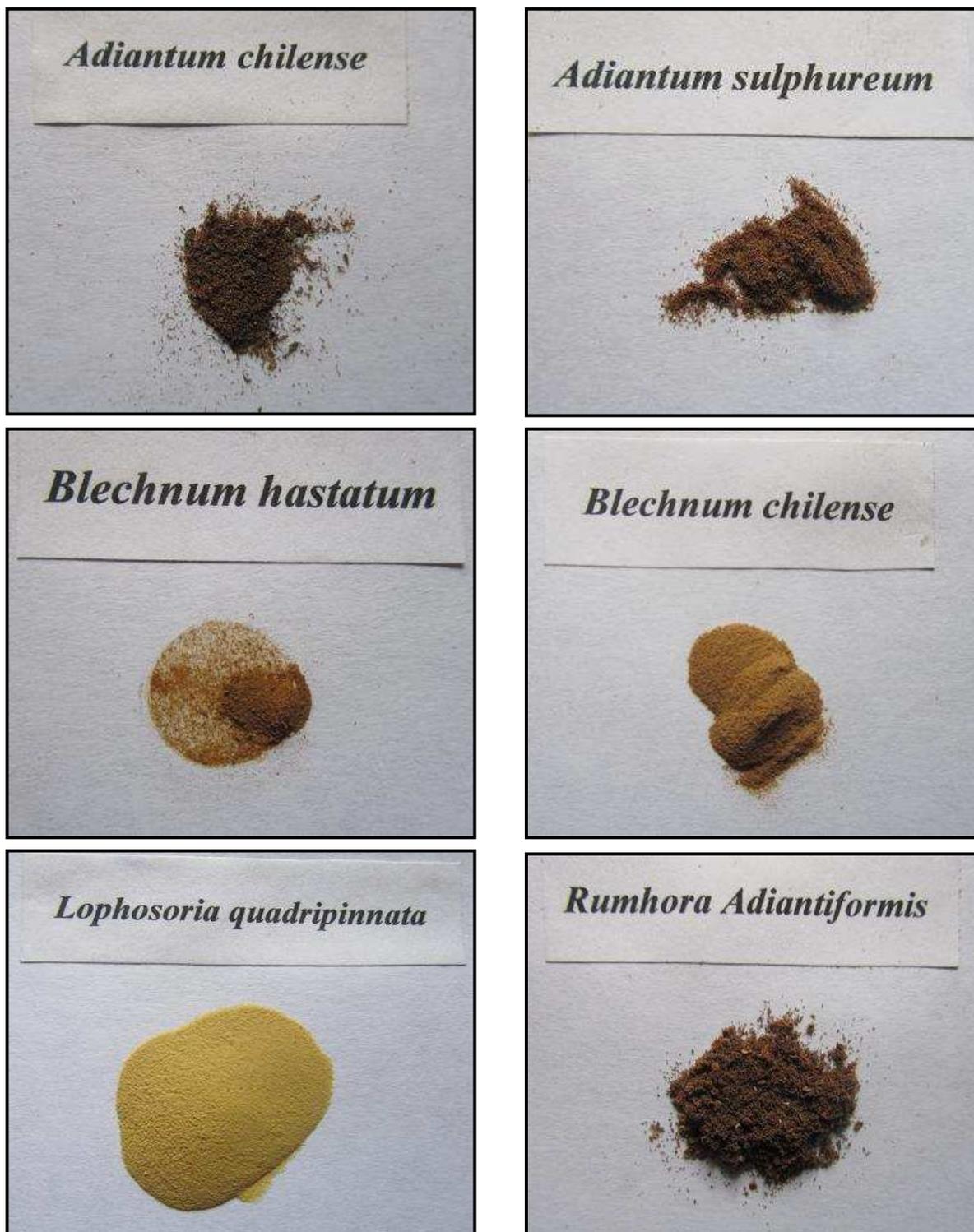


Figura 5. Esporas de las distintas especies de helechos utilizadas en el ensayo.

3.2.5 Elaboración de matrices de alginato de calcio. Para la elaboración de esferas de alginato de calcio se mezclaron dos reactivos químicos, alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio, cada uno disuelto en agua destilada para lograr una buena homogenización.

3.2.6 Esterilización del sustrato. El sustrato corresponde a una mezcla de 2 kg de tierra de hojas y 1 kg de humus de lombriz (2:1) el cual se esterilizó y reesterilizó en Autoclave almacenado en bolsas plásticas. El proceso duró aproximadamente 2 horas, y se realizó a una presión de 1 atmósfera y a una temperatura de 121°C.

3.2.7 Siembra de esporas. La siembra de esporas se realizó en bandejas plásticas de 8 * 20 * 3 cm (Ancho * Largo * Alto). La cantidad de sustrato utilizado fue de 130 g. por bandeja y el número de esporas estuvo dado por el peso. En cada bandeja se sembraron 0,02 g. de esporas, correspondiente tanto a esporas encapsuladas como a esporas sin encapsular. En ambos casos las esporas quedaron semicubiertas por el sustrato.

Previo a la siembra, el sustrato fue humedecido con 55 ml de agua destilada, de manera uniforme, luego, el riego se mantuvo con una frecuencia de 1 vez al día (tarde) la primera semana con una cantidad de 25 ml con el fin de otorgar un ambiente de humedad similar al natural donde se encuentran y desarrollan los prótalos, las semanas posteriores el riego se fue alternando día por medio para finalmente reducir la frecuencia al máximo (riego cada 4 días).

3.2.8 Cámara de germinación. Una vez realizada la siembra, se colocaron cada una de las bandejas plásticas en una cámara de germinación de material de vidrio con 3 niveles, lo que permitió el aprovechamiento de la luz natural para simular las condiciones ambientales naturales de los helechos. La temperatura del lugar se controló mediante la colocación de un calefactor al interior del laboratorio, manteniéndola en un rango entre 18° y 24° C.



Figura 6. Cámaras de germinación.

3.3 Ensayo N° 1. Inclusión de esporas de helechos en esferas de alginato de calcio para su posterior siembra en sustrato esterilizado.

El objetivo del ensayo fue establecer una metodología que permitiera determinar el número aproximado de esporas de seis especies de helechos en un volumen determinado, luego las esporas fueron incorporadas en esferas de alginato de calcio para finalmente realizar la siembra.

Antes de incluir las esporas en esferas de alginato, se contabilizaron a través de una superficie, en este caso correspondiente a un 1mm^2 , con el fin de precisar el conteo y posterior peso de estas. Debido al tamaño microscópico de las estructuras, fueron contabilizadas con la ayuda de instrumentos tales como; pinzas, papel milimetrado, lupa estereoscópica y microscopio óptico.

3.3.1 Proceso de Conteo de esporas.

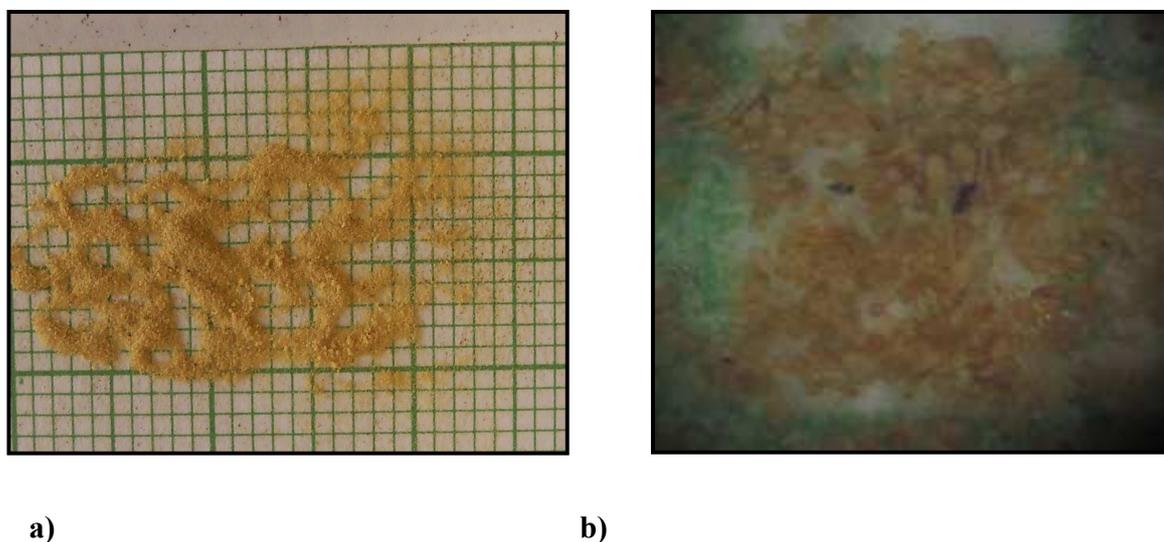


Figura 7. Conteo de esporas. **a)** Superficie de papel milimetrado con esporas de *Lophosoria quadripinnata* **b)** Esporas de *Blechnum chilense* observadas a través de lupa estereoscópica.

3.3.2 Elaboración de esferas de alginato de calcio e incorporación de esporas en esferas.

Para la elaboración de esferas de alginato se disolvió 1,25 g. de Alginato de Sodio en 62,5 ml. de agua destilada. Una vez lograda la mezcla homogénea se pesaron 0,02g. de esporas para luego incluirlas en la mezcla homogenizada de alginato de sodio. Las esporas de las distintas especies de helechos que se incluyeron en las esferas variaron en el número total ya que cada especie presenta un tamaño y peso distinto. Al mismo tiempo se elaboró una mezcla de Cloruro de Calcio, en la cual se disolvieron 6,25 g. de este producto en 62,5 ml. de agua destilada. Una vez disueltos estos dos componentes químicos se procedió a la elaboración a través de una bomba peristáltica la cual se encargó de succionar a una velocidad de 2 ml/minuto, la mezcla homogénea de alginato de sodio + 0,02g de esporas, la cual al caer y entrar en contacto con el cloruro de calcio formó la esfera de alginato, quedando insertas en ellas un número determinado de esporas.

3.3.2.1 Equipos para la elaboración de esfera de alginato.



Figura 8. Bomba peristáltica y matraces para la elaboración de esferas de alginato de calcio.

El ensayo consistió en un total de 4 siembras para cada especie con una cantidad de 0,02g de esporas por bandeja para una superficie de 160 cm² (bandeja), las esporas incluidas en las esferas de alginato fueron sembradas en bandejas con sustrato (tierra de hojas + humus) con la ayuda de una pinza, esta permitió colocar de manera uniforme las esferas en cada surco, completando en cada bandeja un total de 40 esferas. La distancia de siembra fue de 2 cm sobre hilera (SH) y 1,5 cm entre hilera (EH). Las esporas libres se esparcieron sobre el sustrato con un pincel a lo largo del surco de manera uniforme.

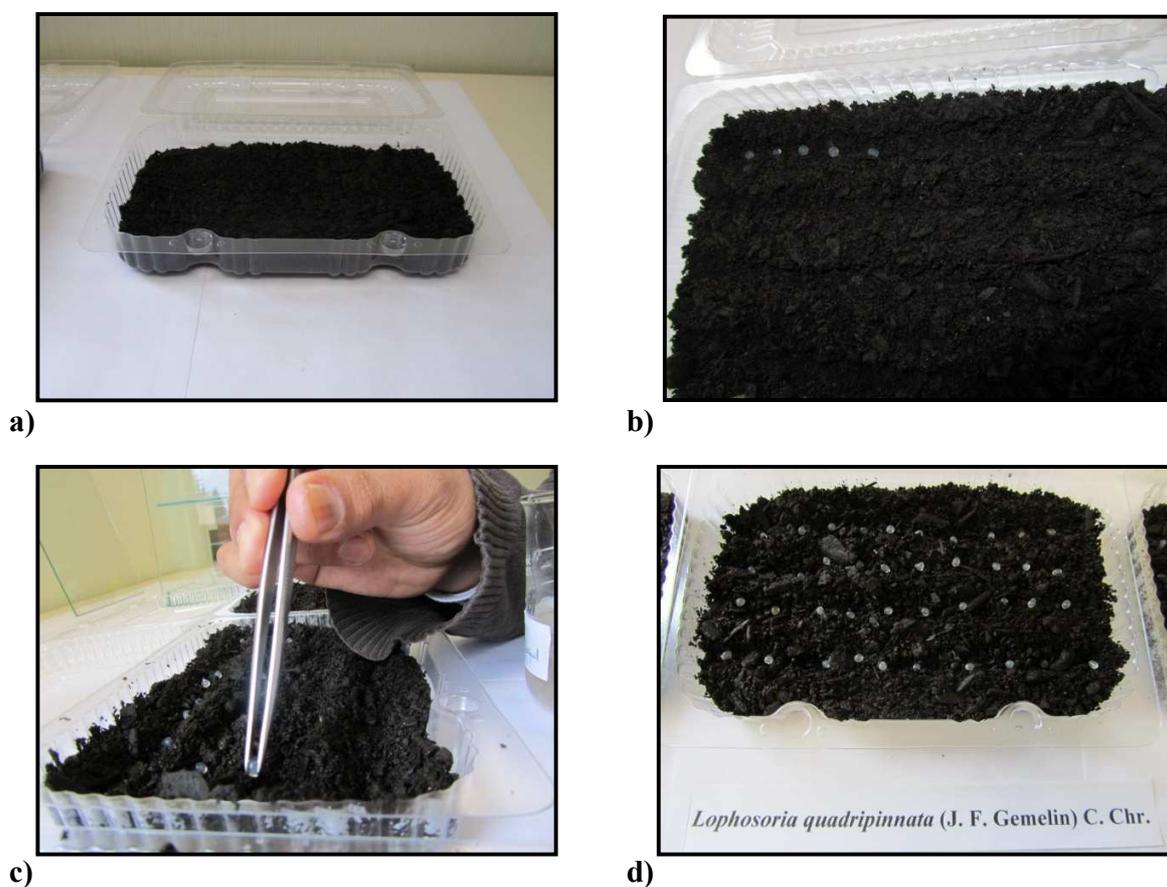


Figura 9. Proceso de siembra de esferas con esporas. **a)** Bandeja con sustrato esterilizado. **b, c y d)** Siembra de esporas contenidas en esferas de alginato.

Las esporas, luego de ser colectadas fueron almacenadas en envases de plástico y vidrio por un período de 4 a 6 semanas, posteriormente se realizó la siembra de cada especie en la misma fecha, lo que permitirá medir de manera simultánea el tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular.

3.3.3 Diseño de siembra

Con el fin de realizar la siembra de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y de esporas sin encapsular se diseñó el siguiente modelo.

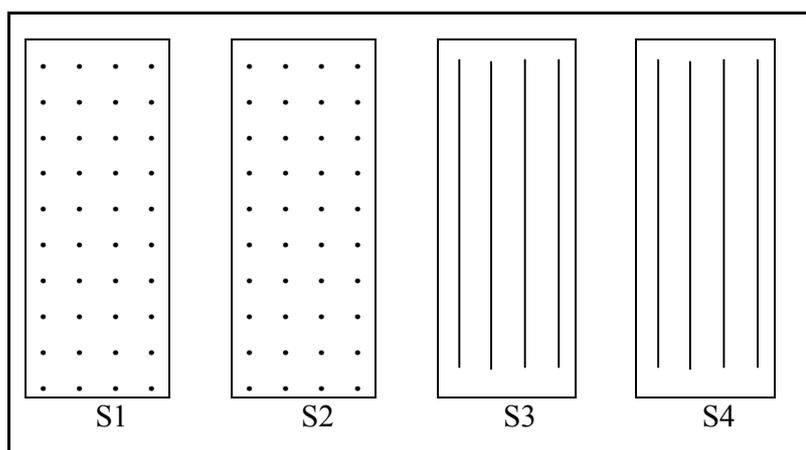


Figura 10. Diseño de siembra de esporas de helechos para cada especie. S1 y S2 esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. S3 y S4 esporas sin encapsular.

3.4 Ensayo N° 2. Tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas y sin encapsular.

La finalidad del ensayo fue observar la presencia de prótalos a partir de esporas encapsuladas y sin encapsular, además de observar si existe diferencia en el tiempo requerido para el desarrollo de prótalos para cada una de las especies sometidas a las mismas condiciones de ambiente.

La siembra para cada una de las especies de helechos fue en la misma fecha, tanto para esporas encapsuladas en esferas de alginato como para esporas sin encapsular. La evaluación de la aparición del prótalo fue cada cinco días desde el momento de la siembra hasta la aparición de las primeras células protálicas, estableciendo un tiempo de 60 días de duración en cada una de las especies.

En el siguiente cuadro se observa la ficha de evaluación y registro del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos, donde se muestra el tiempo transcurrido (días) para cada especie hasta el día en que se logró identificar con certeza una adecuada formación de prótalos sobre el sustrato. (0 = Ausencia de prótalos y 1 = Presencia de prótalos). Ensayo de *Adiantum chilense*.

Cuadro N° 5. Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos.

Día	Esporas sin encapsular	Esporas encapsulada
0	0	0
5	0	0
10	0	0
15	0	0
20	1	0
25		0
30		0
35		0
40		1



Figura 11. Prótalos generados a partir de esporas incluidas en la esfera de alginato de calcio.
Adiantum chilense.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Elaboración de matrices de alginato de calcio.

La elaboración de esferas de alginato e inclusión de esporas en el interior de esta se llevó a cabo con éxito, lo cual quedó comprobado en cada uno de los tratamientos, donde hubo una buena reticulación y homogenización de las esferas. Los resultados obtenidos en la elaboración de las esferas son similares a los obtenidos por Romeau (2001), quien al usar la misma concentración de reactivos obtuvo una correcta elaboración y reticulación de las mismas 24 horas después de la elaboración.

Para lograr la correcta elaboración de las esferas mediante la bomba peristáltica se realizó un ensayo preliminar de acuerdo a la velocidad a utilizar en dicha producción. Se generaron ensayos con velocidad de 6, 3 y 2 ml/min. esta última fue la más adecuada para lograr una buena formación de las esferas.

Tabla N° 1. Elaboración de esferas de alginato de calcio.

1,25 g. Alginato de sodio + 0.02g de Esporas	Velocidad Bomba (ml/min)	Duración del Proceso (min)	Producción Promedio gotas de Alginato por Minuto	Producción Total de Esferas por Solución
<i>A. chilense</i>	2	5.0	146	730
<i>A. sulphureum</i>	2	5.5	158	869
<i>R. adiantiformis</i>	2	5.5	140	770
<i>L. quadripinnata</i>	2	5.0	160	800
<i>B. chilense</i>	2	4.5	172	774
<i>B. hastatum</i>	2	5	176	880

De acuerdo al ensayo realizado se puede estimar el número de esferas producidas por unidad de volumen de reactivos, lo que arroja diferencias en la producción.

El Promedio de Medida de una esfera es de 4,5 mm de ancho por 5mm de largo. Las formas que presentaron las distintas esferas fueron: circular y ovoide. Además presentaban una consistencia gelatinosa y transparente.



Figura 12. Esferas de alginato de calcio elaboradas para el encapsulamiento de esporas de helechos nativos.

4.2 Número de esporas incluidas en esferas de alginato de calcio.

Para cada una de las especies de esporas a incluir en las esferas, en primer lugar, se determinó el número a través de un conteo manual, utilizando instrumentos de laboratorio para precisar la cantidad. Posteriormente se estimó la cantidad de esporas en 1 cm^2 de acuerdo al volumen de estas en un 1 mm^2 . Se estableció un peso de 0,02g de esporas para cada especie a ser incluida en la mezcla de alginato de sodio, esto se realizó para tener certeza del peso que presentan las esporas, ya que para pesar 0,01g existe una alta probabilidad que exista variación en el peso con el instrumento utilizado.

A continuación se muestra el número aproximado de esporas en 1 mm^2 , al mismo tiempo se realiza una proyección en 1 cm^2 esto con el objetivo de estimar de manera aproximada el número total de esporas encapsuladas en una esfera de alginato de calcio.

Tabla N° 2. Conteo y número de esporas por esfera.

Especie	N° de esporas en 1 mm^2	N° de esporas en 1 cm^2	cm^2	N° de esporas en 0.02g	N° de esferas elaboradas	N° de esporas en cada esfera
<i>A. chilense</i>	240	24000	4	96000	730	131
<i>A. sulphureum</i>	260	26000	4	104000	869	119
<i>B. chilense</i>	130	13000	7	91000	770	118
<i>B. hastatum</i>	266	26600	6	159600	800	199
<i>L. quadripinnata</i>	120	12000	6	72000	774	93
<i>R. adiantiformis</i>	160	16000	5	80000	880	90

En la tabla anterior se observa la diferencia en el número de esporas de las distintas especies en 1 mm^2 , a su vez la producción de esferas y número de esporas en cada una de estas presentan diferencias entre las distintas especies.

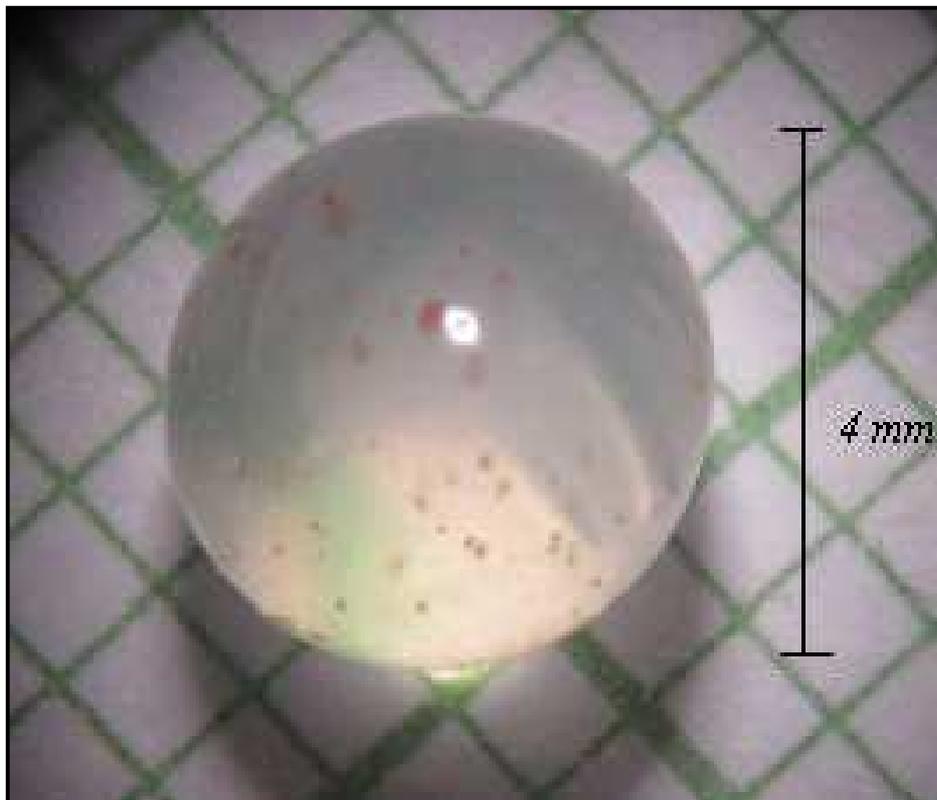


Figura 13. Esfera de alginato de calcio con inclusión de esporas.

4.3 Tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas y sin encapsular.

4.3.1 *Adiantum chilense*. De acuerdo a los dos métodos de siembra utilizados en el experimento, para el ensayo de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio, la observación de prótalos ocurrió alrededor de los días 40 y 45 posterior a la siembra. A medida que transcurrían los días se observó el desarrollo de prótalos.

Para el ensayo de esporas sin encapsular, la aparición de los primeros prótalos se observó alrededor de los días 20 y 25 posterior a la siembra. Este tiempo requerido para la observación de desarrollo de prótalos concuerda con lo expresado por Rodríguez *et al* (2000), quienes

determinaron la aparición de células protálicas 14 días posterior a la siembra en el género *Adiantum*. Los primeros prótalos se observaron a través de la lupa estereoscópica como pequeños puntos de color verde. No obstante, estos resultados difieren a los obtenidos por Naour (2004), quien pudo observar el desarrollo de prótalos solo 35 días después de la siembra.

En el interior de la cámara de germinación durante los días de evaluación no se encontraron evidencias de contaminación ya sea por hongos u otros microorganismos, a pesar de que el ensayo estuvo sometido a altos niveles de humedad por un prolongado periodo de tiempo. Esto concuerda con lo realizado por Levet (2003) ya que antes de sembrar las esporas esterilizó el sustrato. Otro factor que ayudó a la no contaminación fue realizar pequeños orificios en la tapa de las bandejas, esto permitió una eficiente ventilación en el interior, con lo cual se evita la proliferación de microorganismos contaminantes.

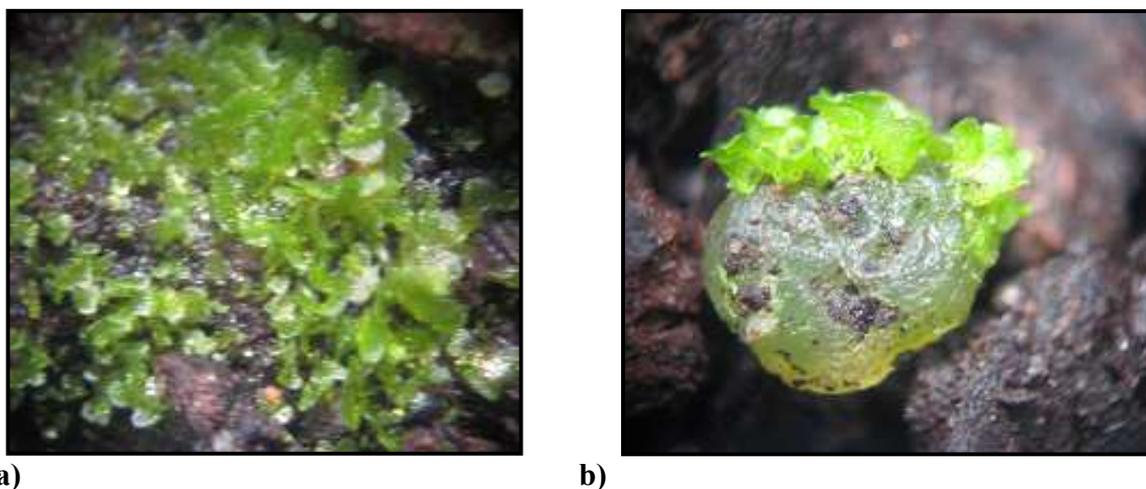


Figura 14. Observación macroscópica de prótalos *Adiantum chilense* **a)** Formación de Prótalos a partir de esporas sin encapsular, 20 días posterior a la siembra. **b)** Formación de prótalos a partir de esporas encapsuladas, 40 días posterior a la siembra.

Tabla N° 3. Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. *Adiantum chilense*.

Día	Esporas sin encapsular	Esporas encapsuladas
0	0	0
5	0	0
10	0	0
15	0	0
20	1	0
25		0
30		0
35		0
40		1

En la tabla anterior se presentan los resultados obtenidos en relación a la diferencia de tiempo para la aparición de prótalos de la especie *Adiantum chilense*. (**0** = Ausencia de prótalos; **1**= Aparición de Prótalos).

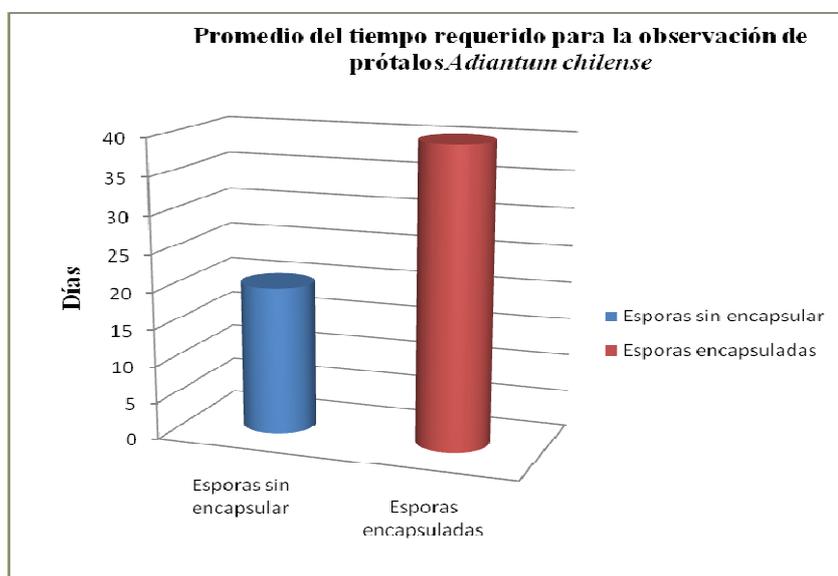


Figura 15. Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. *Adiantum chilense*.

4.3.2 *Blechnum hastatum*. La primera observación de prótalos desarrollados originados a partir del ensayo con esporas encapsuladas se evidenció entre el día 40 y 45.

La aparición de prótalos en esporas sin encapsular se evidenció entre el día 20 y 25 posterior a la siembra. Estos resultados coinciden con lo dispuesto por Naour (2004), quien observó prótalos a través de la lupa estereoscópica el día 17 posterior a la siembra.

En relación a la contaminación no se evidenció la presencia de microorganismos contaminantes en las siembras para la totalidad de los ensayos, lo cual permitió una adecuada visualización de prótalos a través de la lupa estereoscópica.



a)



b)

Figura 16. Observación macroscópica de prótalos *Blechnum hastatum* a) Formación de Prótalos a partir de esporas sin encapsular, 25 días posterior a la siembra. b) Formación de prótalos a partir de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio, 40 días posterior a la siembra.

Tabla N° 4. Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. *Blechnum hastatum*.

Días	Esporas sin encapsular	Esporas encapsuladas
0	0	0
5	0	0
10	0	0
15	0	0
20	0	0
25	1	0
30		0
35		0
40		1

En la tabla anterior se presentan los resultados obtenidos en relación a la diferencia de tiempo para la aparición de prótalos de la especie *Blechnum hastatum*, por un periodo de 2 meses. (0 = Ausencia de prótalos; 1= Aparición de Prótalos).

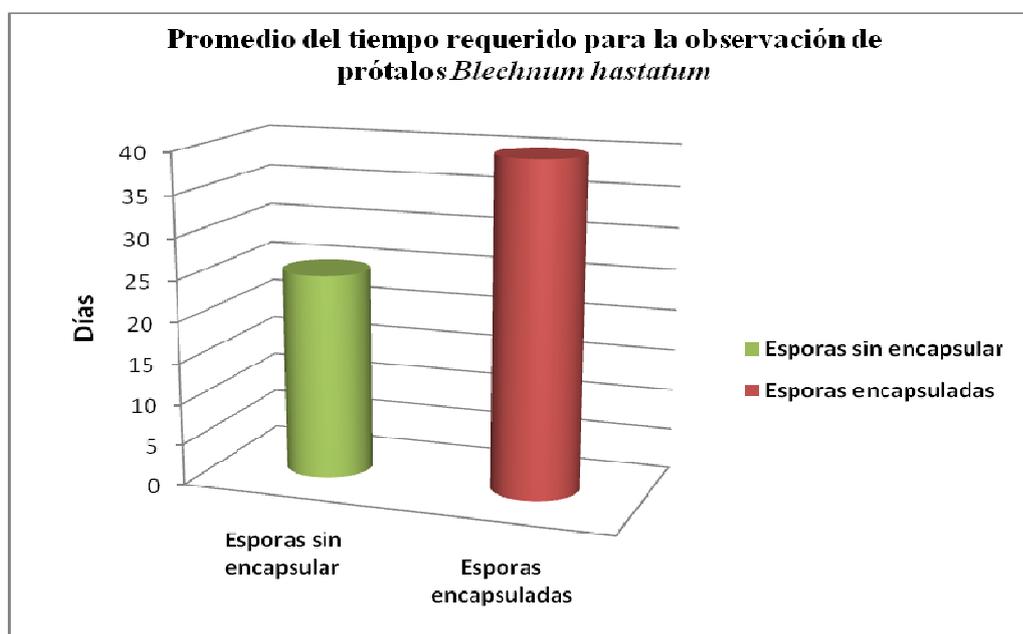


Figura 17. Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. *Blechnum hastatum*.

4.3.3 *Lophosoria quadripinnata*. Para el ensayo de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio, la presencia de prótalos fue observada a través de la lupa estereoscópica a partir del día 60 posterior a la siembra.

Las esporas sin encapsular, al igual que aquellas encapsuladas tuvieron un prolongado tiempo para presentar prótalos desarrollados, evidenciando las primeras estructuras a partir del día 45 posterior a la siembra. A diferencia con las células protálicas de los demás ensayos, esta germinación no presentó la uniformidad esperada. Estos resultados son similares a los obtenidos por Baeza (2001), el cual señala que el tiempo de aparición de los primeros prótalos puede ir de 3 a 6 semanas en las esporas de los helechos, variando en las distintas especies.

El ensayo no presentó contaminación de microorganismos en la cámara de germinación, lo cual, se debe a la correcta esterilización del sustrato, a la buena manipulación de las esporas tanto en la colecta como en el almacenamiento previo a la siembra y al buen manejo de higiene que hubo en el ensayo. Lo anterior permitió visualizar y corroborar la presencia de células protálicas en cada una de las bandejas.

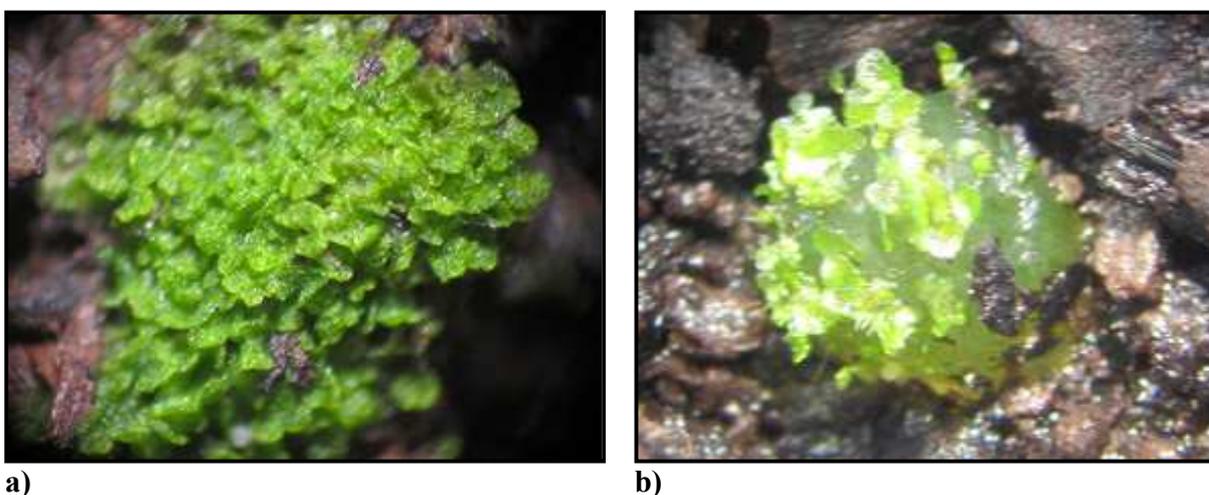


Figura 18. Observación macroscópica de prótalos *Lophosoria quadripinnata* **a)** Formación de prótalos a partir de esporas sin encapsular, 45 días posterior a la siembra. **b)** Formación de prótalos a partir de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio 60 días después de la siembra.

En la tabla N° 5 se presentan los resultados obtenidos en relación al tiempo requerido para la aparición de prótalos de la especie *Lophosoria quadripinnata*, por un periodo de 2 meses. (0 = Ausencia de prótalos; 1= Aparición de Prótalos).

Tabla N° 5. Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. *Lophosoria quadripinnata*.

Días	Esporas sin encapsular	Esporas encapsuladas
20	0	0
25	0	0
30	0	0
35	0	0
40	0	0
45	1	0
50		0
55		0
60		1

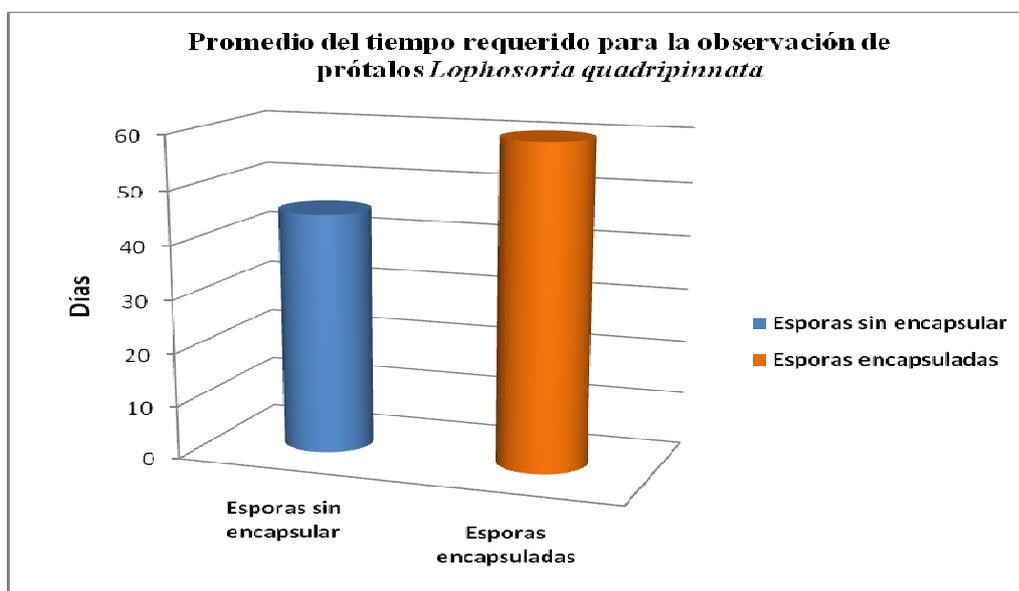


Figura 19. Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. *Lophosoria quadripinnata*.

4.3.4 *Rumohra adiantiformis*. La aparición de los primeros prótalos en el ensayo de esporas encapsuladas se produjo a partir del día 45 posterior a la siembra.

Para el ensayo de esporas sin encapsular se observó que a partir del día 25 a 30 después de sembrar se produjo la aparición de células protálicas en el sustrato, en comparación a las esporas encapsuladas se observa una germinación con mayor grado de uniformidad. Esto concuerda con lo señalado por Baeza (2001), el cual en resultados obtenidos en sus ensayos, corroboró la presencia de prótalos a los 13 días posterior a la siembra. Las primeras células protálicas evidenciadas a través de la lupa estereoscópica fueron observadas como pequeños puntos verdes en forma de corazón, a simple vista se creía en la contaminación del medio por musgos y hepáticas, finalmente se verifica la presencia de prótalos.

Respecto a la contaminación del ensayo al igual que en los demás, existe una escasa o nula presencia de agentes contaminantes, lo cual no exige la limpieza del medio, permitiendo de esta forma una correcta visualización de los prótalos generados.

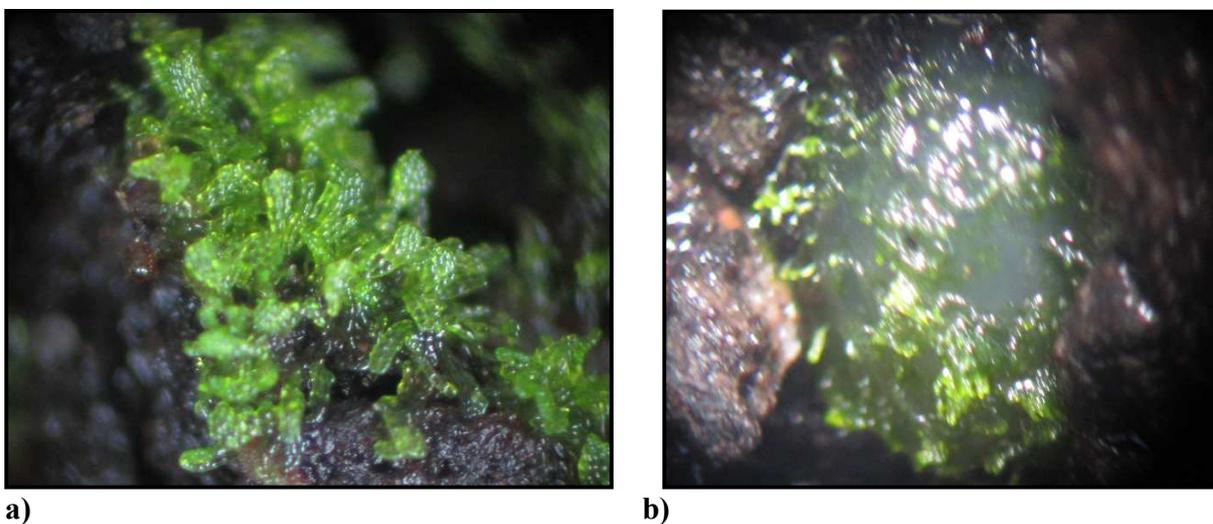


Figura 20. Observación macroscópica de prótalos de *Rumohra adiantiformis* **a)** Formación de prótalos a partir de esporas sin encapsular, 25 días posterior a la siembra. **b)** Formación de prótalos a partir de esferas de alginato de calcio 45 días posterior a la siembra.

Tabla N° 6. Evaluación del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos. *Rumohra adiantiformis*.

Días	Esporas sin encapsular	Esporas encapsuladas
0	0	0
5	0	0
10	0	0
15	0	0
20	0	0
25	1	0
30		0
35		0
40		0
45		1

En la tabla anterior se presentan los resultados obtenidos en relación al tiempo requerido para la aparición de prótalos de la especie *Rumohra adiantiformis*, por un periodo de 2 meses. (0 = Ausencia de prótalos; 1= Aparición de Prótalos).

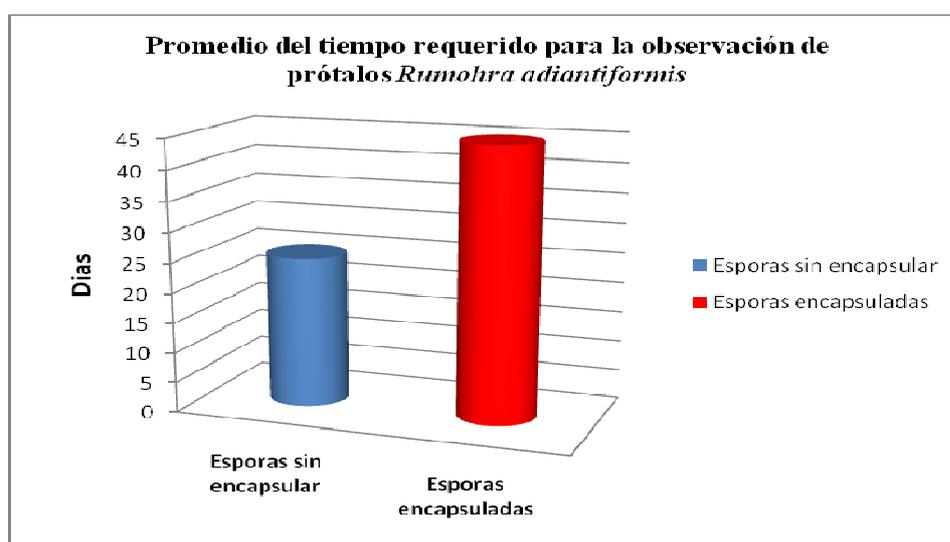


Figura 21. Promedio del tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas sin encapsular y esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio. *Rumohra adiantiformis*.

4.3.5 *Adiantum sulphureum*. De acuerdo al tiempo de duración del ensayo, tanto en esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular, no se visualizaron prótalos para los distintos tratamientos. Estos resultados no concuerdan con lo establecido por Rodríguez *et al* (2000), quienes determinaron la aparición de células protálicas 14 días posterior a la siembra en el género *Adiantum*.

El ensayo no presenta problemas de contaminación de agentes externos que pudieran incidir en la germinación y posterior desarrollo de prótalos. Por lo que se atribuye la nula aparición de células protálicas a factores tanto internos como a factores del medio que impiden la germinación en el período estipulado para el ensayo.

4.3.6 *Blechnum chilense*. No se observó desarrollo de prótalos tanto de esporas sin encapsular como en esporas encapsuladas en el tiempo establecido del ensayo. Los resultados difieren a los obtenidos por Naour (2004), quien visualizó células protálicas de esta especie 10 días posterior a la siembra. Similares resultados obtuvo Levet (2001), quien observo esporas sometidas a una temperatura de 21° C. de almacenamiento por un periodo de 2 meses, se produjo la germinación 9 a 16 días después de la siembra.

El sustrato no presentó contaminación de microorganismos patógenos por lo que se atribuye la nula germinación de esporas a factores intrínsecos del propágalo como a factores del medio externo.

A continuación se presenta un grafico comparativo en relación al tiempo requerido para la observación de prótalos de seis especies de helechos nativos, donde se observa la diferencia de tiempo que existe entre la aparición o el desarrollo de prótalos tanto en esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular. La diferencia promedio de la visualización de prótalos para cada tratamiento es aproximadamente de 20 días.

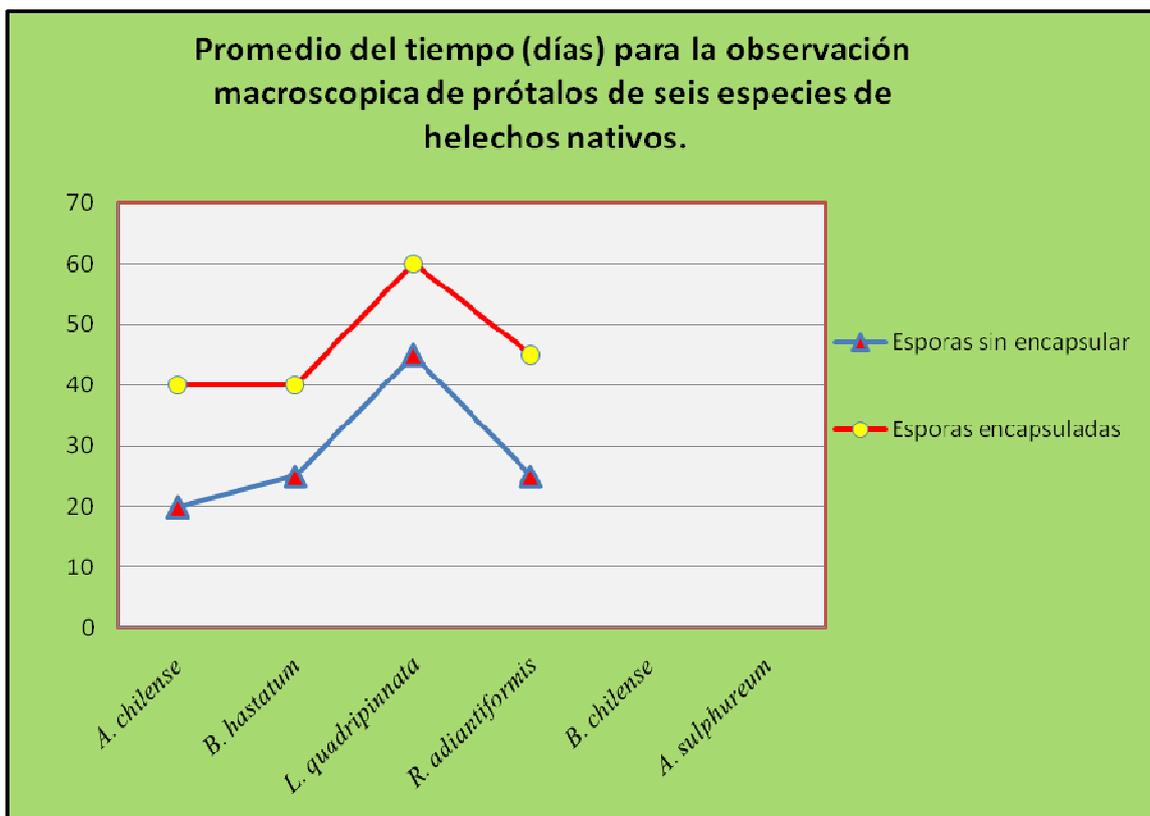


Figura 22. Comparación del promedio de tiempo para la observación macroscópica de prótalos a partir esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular, de seis especies de helechos nativos.

4.3.7 Discusión general. El trabajo realizado permitió estimar el número aproximado de esporas para el encapsulamiento de cada una de las especies de helechos utilizados, además se evaluó el tiempo requerido para la observación de prótalos a partir de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular.

Actualmente no existen antecedentes del uso de este tipo de práctica para especies de helechos, sin embargo se recomienda la utilización de matrices de alginato de calcio para el encapsulamiento de esporas de helechos nativos ya que permite una adecuada manipulación en el traslado y colocación en el sustrato para la posterior germinación de las esporas incluidas, tanto por el tamaño, morfología y densidad de este transportador.

La utilización de esferas de alginato de calcio actúa como un elemento protector que no impide la germinación de las esporas y posterior desarrollo de prótalos contenidos en ellas. Sin embargo de acuerdo a lo realizado existe una diferencia en el tiempo requerido para la observación macroscópica de prótalos a partir de esporas encapsuladas en esferas de alginato de calcio y esporas sin encapsular (Figura 22).

Este estudio permite incorporar una nueva metodología para la propagación de helechos. Los beneficios de la utilización de esta técnica podrían ser aplicables a procesos como estabilización de taludes, restauración ecológica y procesos de reforestación. Al igual que las esporas en este transportador se pueden incorporar otro tipo de propágulos.

Con el fin de generar mayor información respecto a la utilización de matrices de alginato de calcio y garantizar mejores resultados, futuros trabajos deberán establecer la relación entre la viabilidad y la densidad de la esfera de alginato de calcio.

5 CONCLUSIONES

- La inclusión de esporas de helechos en esferas de alginato de calcio es posible de acuerdo al protocolo que se ha generado a partir de este trabajo.
- La inclusión de esporas de helechos en esferas de alginato permite dosificar el material reproductivo para ser utilizado con estos fines.
- La utilización de matrices de alginato de calcio garantiza una mejor manipulación y transporte de este tipo de propágulos para el establecimiento de plantas de helechos.
- El tiempo de almacenamiento de esporas de helechos incide en la capacidad germinativa de las esporas, tanto en aquellas que fueron incluidas en matrices de alginato de calcio, como aquellas que fueron sembradas de manera directa o sin él transportador.
- Con este trabajo se establecen las bases para futuras aplicaciones de diversos propágulos de plantas con fines de restauración ecológica, estabilización de taludes y procesos de reforestación.

6 RESUMEN

Chile, posee diversos tipos de ecosistemas naturales, uno de ellos corresponde a los ecosistemas boscosos nativos presentes en la zona sur, los cuales se caracterizan por presentar diversas asociaciones en su composición, estructura y funcionalidad. Sin embargo, a través del tiempo la flora nativa del sur del país ha sufrido un constante desequilibrio lo que ha generado que parte importante de las especies presenten problemas de conservación. Uno de los factores y quizá el más importante del último tiempo que ha generado la pérdida de biodiversidad es la intervención antrópica debido a que ha habilitado extensas aéreas para las distintas actividades. Un grupo primitivo de plantas correspondiente a la flora pteridophytica es una de las especies que ha sido afectada negativamente ya que de acuerdo a la evolución obtenida han colonizado ambientes con altos niveles de humedad y sombríos.

Con el fin de evitar la pérdida constante de material reproductivo de los helechos nativos de la región, el siguiente trabajo tiene por objetivo establecer un protocolo que permita el encapsulamiento de esporas de helechos en esferas de alginato de calcio y establecer una nueva metodología de propagación de helechos. Se visitaron diversas localidades de la región de la Araucanía correspondiente a ecosistemas naturales boscosos donde existe flora pteridophytica, donde se extrajo el material vegetal para luego ser llevadas al laboratorio de Biología Vegetal de la Universidad de La Frontera y así realizar los distintos ensayo, tanto de elaboración de las esferas de alginato de calcio, inclusión de esporas en esferas y siembra de las esporas.

Según los resultados obtenidos en el estudio, la incorporación de esporas en esferas de alginato no solo permite almacenar y resguardar del medio externo a la estructura reproductiva, sino además permite una mejor dosificación, optimizando la cantidad de material a reproducir, además de estimar el número de esporas incluidas en cada una de las matrices. Los resultados de generación de prótalos a partir de esporas encapsuladas y esporas sin encapsular permiten concluir que existe diferencia en el tiempo de aparición de prótalos entre las especies y los tratamientos.

7 SUMMARY

Chile, possesses diverse types of natural ecosystems, one of them corresponds to the wooded native present ecosystems in the south zone, which are characterized for presenting diverse associations in his composition, structure and functionality. Nevertheless, slant of the time the native flora of the south of the country has suffered a constant imbalance what has generated that departs importantly from the species present problems of conservation. One of the factors and probably the most important of last time that has generated the loss of biodiversity it is the intervention of the men due to the fact that he has enabled extensive air for the different activities. A primitive group of corresponding plants to the flora pteridophytica is one of the species that has been affected negatively since in agreement to the obtained evolution they have colonized environments with high levels of dampness and shaded.

In order to avoid the constant loss of reproductive material of the native ferns of the region, the following work has for aim establish a protocol that allows the encapsulamiento of spores of ferns in spheres of alginato of calcium and establish a new methodology of spread of ferns. There were visited diverse localities of the region of the Araucanía corresponding to natural wooded ecosystems where flora exists pteridophytica où le matériel végétal a été extrait pour tout de suite être porté au laboratoire de Biologie Végétale de l'Université de La Frontière et ainsi réaliser les distincts a répété, tant d'une élaboration des sphères d'alginato d'un calcium, une inclusion de spores dans des sphères et des semilles des spores.

According to the results obtained in the study, the incorporation of spores in spheres of alginato not only allows to store and to protect from the external way to the reproductive structure, but in addition it allows a better dosing, optimizing the quantity of material to reproduce, beside estimating the number of spores included in each of the counterfoils. The results of generation of prótalos from encased spores and spores without encasing allow to conclude that difference exists in the time of appearance of prótalos between the species and the treatments.

8 LITERATURA CITADA

- Aikins, B. 1997.** Raising ferns from spores. Poste don Fernet. Disponible en <http://www.home.aone.net.au/byzantium/ferns/growing.htm>.
- Arteaga, M., Ramírez, G., Moran, A., Monroy, O. y González, O. 2005.** Estudio de Prefactibilidad para la instalación de una planta productora de alginato de sodio por fermentación con *Azotobacter vinelandii*. Departamento de Biotecnología. División Ciencias Biológicas y de Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico. 337 p.
- Baeza, M., Barrera, E., Flores, J., Ramírez, C. y Rodríguez, R. 1998.** Categorías de conservación de pteridophyta nativas de Chile. Boletín del museo nacional de historia natural N° 47, Santiago, Chile. Disponible en <http://www.graficanimada.cl/sinab/publi-boletin47.html>.
- Baeza, V. 2001.** Multiplicación de especies chilenas de helechos mediante esporas: germinación y desarrollo del prótalo en cultivo *in vitro* y en sustrato estéril. “Tesis para optar al grado de Licenciado de Agronomía”. Universidad Austral. Valdivia, Chile. 76p.
- Bashan, Y., and Gonzalez, L. 1998.** Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azopirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. Applied Microbiology and Biotecnology. 51 (2). 262-266.
- Bashan, Y., Hernandez, J., Puente, M., de-Bashan, L. y Leyva, L. 2002.** Inoculantes microbianos sintético; ¿son el futuro para la agricultura? Grupo de Microbiología Ambiental, centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz. México. BCS 23090.
- Carrillo, R. 2000.** Propagación de helechos chilenos con potencialidad ornamental. 51er Congreso Agronómico de Chile.

- Ciampi, L. 2005.** Estado del Arte. El control biológico y su aplicación a situaciones productivas. La bioencapsulación. <http://www.bioinsumos.cl/p_arte1112.htm. (30 oct. 2005).
- Ciampi, L. Bernal, G., Oyarzun, J., Schobitz, R. y Fuentes, R. 1997.** Atrapamiento de células bacterianas en matrices de alginato para el control biológico de agentes fitopatógenos. *Acta Microbiológica de Chile* 7: 28-30.
- Constantino, S., Santamaría, L. y Hodson, E. 2000.** Storage and *in vitro* germination of tree fern spores. *Botanic Gardens Micropropagation News*. 2(4).
- Díaz de Apodaca, E., Villagrán, M., Río, F., Ramírez, C. y Lorenzo, L. 2007.** Utilización de adsorbentes basados en quitosano y alginato sódico para la eliminación de iones metálicos: Cu⁺², Pb⁺², Cr⁺³ y Co⁺². España. *Revista Iberoamericana de Polimeros*. Vol. 8 (1). 37p.
- Donoso, C. 1994.** Ecología Forestal. El bosque y su medio ambiente. Editorial Universitaria. Santiago. Chile. 369 p.
- Donoso, C. y Lara A. 1999.** Silvicultura de los Bosques Nativos de Chile. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- FIA, 2008.** Proyecto de Innovación en X Región de Los Lagos. Resultados y Lecciones en Helechos Nativos. 28 p.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., y Mulligan, C. N. 1999.** “La encapsulación en la Industria Alimentaria”. *Revista Internacional de Ciencias de la Alimentación y Nutrición*, vol. 50, issue 3, p 213, ISSN 09637486. 50, número 3, p 213, ISSN 09637486.
- Godoy, R., Ramírez, C., Figueroa et al. 1981.** Estudios Ecosociológicos en Pteridofitos de Comunidades Boscosas Valdivianas, Chile. *Bosque (Valdivia)*. [online]. 1981, vol.4, no.1 [citado 05 Julio 2010], p.12-24. Disponible en la World Wide Web:

<http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071792001981000100002&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-9200.

Godoy, R y Figueroa, H. 1989. Composition and distribution of the pterodiphytic flora in continental and insular Chile. *Nova Hedwigia*. Volumen 48. N° 3-4. pp. 437-453.

Godoy, R. 1989. Espectro biológico de la flora pteridophytica de Chile continental e insular. *Anales Jardín Botánico, Madrid*. Vol. 46. N° 2. Pp. 599-603.

Gunckel, H. 1984. Helechos de Chile. Ediciones Universidad de Chile. Santiago, Chile. Editorial Universitaria. 245p.

Hartmann, H. y Kester, D. 1995. Propagación de plantas: Principios y prácticas. Editorial Continental S.A. Mexico. P. 760.

Hill, J.; Overholts, L.; Popp, H. y Grove, A. 1964. Tratado de Botánica. Barcelona, España, Omega 747pp.

INFOAGRO, 2010. El cultivo del helecho. Curso online. Disponible en http://www.infoagro.com/flores/plantas_ornamentales/helechos.htm.

Jensen, W y Salisbury, F. 1988. Botánica. México. 2° Edición McGraw-Hill. 761p.

Levet, O. 2003. Efecto del Almacenamiento y criopresevación de esporas en la formación de prótalos de helechos nativos presentes en la IX Región. Tesis, Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Agropecuarias Y Forestales. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile.

Macaya, J. 2004. Helechos nativos de Chile cultivados con fines ornamentales. *Chloris Chilensis*, Año 7; N° 1. URL: <http://www.chlorischile.cl>

McHugh, 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper N°. 441.105 p. Roma. Italia.

- Morales, C., Montes, S., Paneque, V. y Corbera, J. 2003.** Aclimatación de vitroplantas de helechos a través del cultivo *in vitro* de esporas utilizando diferentes sustratos formados a partir de distintos abonos orgánicos. Cultivos Tropicales, Cuba, volumen 24, n° 3. 29-31p.
- Moran, R.C. 2004.** Natural History of Ferns. Portland-Cambridge. Timber Press. Inc. Portland, Oregon U.S.A. Pp:15-42
- Naour, K. 2004.** Efecto de la desinfección de esporas, intensidad de luz y cloración del agua de riego, sobre el desarrollo de helechos exóticos y nativos presentes en Chile. Tesis, Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad Católica de Temuco. Chile.
- Palmengarten, 1992.** Helechos de Chile. En: Grau J. & G. Zizka (eds). Flora silvestre de Chile., Sonderheft 19: 80:85
- Paz, S. 2007.** Implicaciones ecológicas de la extracción de helechos arborescentes en la cuenca media del río Capáz, municipio Andrés Bello, estado Mérida, Venezuela. Documento. XVII Congreso Botánico de Venezuela. Estado de Mérida, Venezuela. p. 439-442.
- Pera, J., Alvarez, I. y Parlade, J. 1998.** Eficacia del inoculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la memorización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pseudotsuga menziesii* en contenedor. Departamento de Patología Vegetal. IRTA. Barcelona, España. Revista investigación Agr: Sist. Rec. For. Vol 7 (1 y 2), 1998.
- Ramírez, M., Pérez, B. y Riba, R. 2000.** El suelo Un Banco Natural de Esporas y Helechos. Depto. De Biología. Área de Biología Estructural y Sistemática Vegetal, UAM. México.
- Ramírez S y Sánchez A. 2007.** Las Pteridofitas del Estado de Hidalgo. Herreriana Revista de Divulgación de la Ciencia. (México). 3(1): 1-2.
- Rodríguez, R. 1989a.** Comentarios fitogeográficos y taxonómicos de Pteridophyta chilenos. Gayana, Botánica. 46, 3-4: 199-208

- Rodríguez, M. 2002.** Los helechos, un grupo de vegetales primitivos, CD ROM resumen XIV Jornadas De Extensión Agrícola: Alternativas de producción agrícola exportables para el Sur de Chile, universidad Católica De Temuco, Temuco. Chile
- Rodríguez, R., D. Alarcón y J. Espejo. 2009.** Helechos Nativos del Centro y Sur de Chile. Guía de Campo, Ed. Corporación Chilena de la Madera, Concepción, Chile, 212 p.
- Rosales, J. 2005.** Micropropagación de Calahuala *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger con tres tipos de explantes en diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis presentada a la Universidad de San Carlos de Guatemala para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Guatemala. 73 p.
- Roumeau, M. 2001.** Evaluación de la degradación de esferas de alginato de calcio utilizadas en la memorización de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill., producidas en corteza de pino. Tesis, Ingeniería Forestal, Facultad de Ciencias Agropecuarias Y Forestales. Universidad de La Frontera. Temuco. Chile.
- Sánchez L., Arreguín M y Fernández R. 2008.** Gametofitos y Esporofitos Jóvenes de dos pteridofitas: *Asplenium monanthes* L. (Aspleniaceae-Pteridophyta) y *Elaphoglossum minutum* (Phol ex fée) T. Moore (Lomaripsidaceae-Pteridophyta). Polibotánica (México). 1(25): 29-43.
- Sociedad de Ciencias Naturales de Sestao, 2001.** Helechos Paleotropicales de la Comunidad Autónoma Vasca. Situación actual y algunos apuntes para su conservación. Estudio subvencionado por el Departamento de Agricultura y Pesca del gobierno Vasco. 80 pp.
- Tacón A., Fernández U., y Ortega F. 2000.** El Mercado de los PFTM y su Papel en la Conservación de la Ecorregión de los Bosques Valdivianos. Red de productos PFTM de Chile. Proyecto FB 80. WWF-CODEFF.