

OBTENCIÓN DE GAMETÓFITOS Y ESPORÓFITOS DEL HELECHO CACHO DE VENADO (*Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr.) A PARTIR DE ESPORAS

José Ángel Gómez Llaca y Josefina Páez de Casares

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Área de Propagación Controlada. Instituto de Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay estado Aragua. Venezuela. joseangelgomezllaca@gmail.com

COMPENDIO

Para mejorar la propagación *in vivo* del helecho cacho de venado (*Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr.) se iniciaron varias investigaciones partiendo de esporas. Las mismas fueron sembradas sobre varios sustratos en frascos herméticos o en bolsas plásticas bajo cámara húmeda y en dos ambientes. La germinación ocurrió en las bolsas bajo cámara húmeda en todos los sustratos menos en el de humus de lombriz y arena 1:1 bajo sarán. Cuando se usaron frascos herméticos, la germinación de las esporas se produjo en todos los sustratos y ambientes, seguida de su muerte. Se realizaron tres ensayos complementarios para determinar el mejor sistema de propagación para esta especie; en el primero, las esporas fueron sembradas en frascos de vidrio o en recipientes sin drenaje, obteniendo esporófitos luego de seis meses en este último. En el segundo ensayo se realizaron tratamientos previos a la siembra por remojo en agua o escarificación en ácido sulfúrico de las esporas para luego ser sembradas en frascos herméticos o recipientes sin drenaje; no se observó germinación de esporas. Para el último experimento las esporas se sembraron en una maceta contentiva de una mezcla de arena lavada y tierra, protegidas con una tapa de vidrio sobre una bandeja llena de agua, en este caso germinaron gran cantidad de esporas y se formaron esporófitos en cuatro meses. En conclusión, esta especie se propaga *in vivo* en pocos meses y forma esporófitos en grandes cantidades, como se evidenció en el último ensayo.

PALABRAS CLAVE

Esporas, *in vivo*, multiplicación, *Platyserium bifurcatum*, propagación.

**OBTENTION OF GAMETOPHYTES AND SPOROPHYTES OF
THE COMMON STAGHORN FERN FIDE HORTUS THIRD
(*Platycerium bifurcatum* (CAV.) C. CHR.)**

ABSTRACT

To improve the *in vivo* propagation of staghorn fern (*Platycerium bifurcatum* (Cav.) C. Chr.) several studies were initiated based on germination of spores. Spores were sown on several substrates in sealed bottles or plastic bags in humid-chambers under two environments. There was germination in the bags in the humid-chamber in all media except the earthworm humus and sand 1:1 under saran. There was also germination of spores in sealed bottles in all substrates and environments, followed by their. Three additional tests were conducted to determine the best system of propagation of this plant; in the first, spores were sown in glass bottles or containers without drainage, obtaining sporophytes after six months in the latter. In the second trial, treatments were performed prior to planting by soaking in water, or sulfuric acid scarification of spores before being planted in sealed bottles or containers without drainage, there was no germination of spores. For the last experiment, the spores were sown in a pot with mixture of washed sand and earth, protected with a cover glass on a tray full water, in this case a large number of spores germinated, and sporophytes were formed in four months. In conclusion, this plant can be propagated *in vivo* in a few months and form sporophytes in large quantities, as evidenced by the last trial.

KEY WORDS

Spores, *in vivo*, multiplication, *Platycerium bifurcatum*, propagation.

INTRODUCCIÓN

Los helechos no producen semillas por lo que su reproducción sexual depende de la producción de esporas (haploides) microscópicas, resistentes y que al germinar en un medio adecuado desarrollan una planta libre haploide denominada gametófito, generadora de gametas masculinas (móviles) y femeninas (sésiles), las cuales al unirse producen la forma conocida del helecho, el esporófito (Hartman y Kester 1994). Las esporas son producidas en cantidades extraordinariamente grandes, de más de 1 000 esporas/mg en algunas especies (Constantino 1995), observándose pocas variaciones genéticas en las plantas producidas, por lo que la propagación a través de estas estructuras

permite la obtención de cantidades grandes de plantas de buena calidad como ornamentales. Sin embargo, según Chin (1998) este tipo de multiplicación es más lento en comparación con las técnicas tradicionales (separación de brotes o rizomas); pues para obtener plantas de tamaño comercial se requiere más tiempo.

Es posible lograr la propagación de helechos a partir de esporas, bien sea empleando recipientes herméticos con sustrato (Chin 1998), en bandejas de germinación dentro de envases transparentes de alimentos (Plumbridge 1976) o en macetas con drenaje cubiertas con plástico o vidrio (Emmons 1997). En todo caso, lo importante es crear un ambiente hermético, húmedo y limpio para que las esporas se desarrollen sin perturbación (Chin 1998). El helecho cacho de venado o cuerno de ciervo (*P. bifurcatum*), es una especie de belleza excepcional y costo elevado en los viveros. Con los métodos convencionales de separación de brotes se consiguen tasas de multiplicación bajas, debido entre otras cosas a la necesidad de un periodo de recuperación usualmente largo entre cortes, y a la obtención de pocas plantas por planta madre (Márquez 2003).

El objetivo de la presente investigación fue lograr la germinación de esporas del mencionado helecho hasta observar el desarrollo de la fase esporofítica, que es la forma comercial de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las esporas fueron obtenidas de frondas fértiles de plantas madres de helecho cacho de venado (*P. bifurcatum*) cultivadas en el área de propagación controlada del Instituto de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, núcleo Maracay. Éstas fueron recogidas al presentar un grado óptimo de maduración, evidenciado por su coloración castaño oscuro. Los fragmentos de frondas con esporas se lavaron con agua y jabón de pasta azul (Las Llaves, S.A.) por 10 min, se expusieron a luz ultravioleta (5 min), se desinfectaron en etanol por 5 seg, se les aplicó Vitavax® por 3 min e hipoclorito de sodio al 5,25% por 5 min y se enjuagaron con agua destilada desionizada y estéril; finalmente, las esporas junto a los esporangios se separaron de la fronda por raspado con un bisturí. Las esporas (junto con restos de esporangios) así preparadas se usaron en dos experimentos.

EXPERIMENTO 1: SIEMBRA DE ESPORAS EN BOLSAS PLÁSTICAS CON DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES, BAJO CÁMARA HÚMEDA.

Se colocó una cantidad aproximada de 0,06 g de esporas en bolsas plásticas de polietileno negro (250 ml) que contenían uno de los cuatro sustratos probados

(turba y arena 1:1; mantillo de hojas y arena 1:1; humus de lombriz y arena 1:1; arena) previamente desinfectados con vapor de agua y humedecidos. Las bolsas se colocaron dentro de cestas plásticas selladas en el fondo con polietileno para evitar el escape de humedad, en las mismas se mantuvo una película constante de agua. Las cestas se cubrieron con polietileno transparente sostenido mediante alambres gruesos doblados, se tuvo cuidado con la hermeticidad, para ello se presionó firmemente el borde del polietileno contra éstas. Las cestas preparadas fueron colocadas bajo dos ambientes (sombra natural proporcionada por árboles y bajo sombreadero de tela de sarán con una incidencia lumínica de 50-250 y 100-200 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente). Semanalmente, se revisó el nivel de la película de agua, reponiéndose de ser necesario. Se realizaron aspersiones de agua semanales sobre los gametófitos ya desarrollados con el fin de estimular la germinación de la fase esporofítica.

EXPERIMENTO 2: SIEMBRA DE ESPORAS EN FRASCOS HERMÉTICOS CON DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES.

Se sembró una cantidad aproximada de 0,06 g de esporas en frascos de vidrio (20 ml) que contenían uno de los cuatro sustratos indicados en el experimento anterior, éstos fueron previamente desinfectados con vapor de agua y humedecidos. Los frascos estuvieron cerrados con tapas plásticas, para que se mantuvieran las condiciones de hermeticidad requeridas y así evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos y los mismos fueron colocados bajo dos ambientes, iguales a los del ensayo anterior. No hubo necesidad de riego dadas las condiciones herméticas de los envases.

En ambos experimentos, el diseño usado fue completamente aleatorizado con ocho tratamientos y diez replicas, cada cesta o frasco constituía una unidad experimental. Las observaciones se realizaron semanalmente durante nueve meses y medio. Las variables observadas fueron: germinación o formación del gametófito, tiempo de germinación, formación del esporofito y sobrevivencia del material vegetal.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS.

En vista de la baja tasa de germinación de las esporas en los dos tratamientos realizados en contraste a lo sugerido en la literatura donde reiteradamente se menciona la gran cantidad de éstas que se pueden obtener de manera sencilla (Chin 1998, Emmonds 1997, Borelli *et al.* 1990), se decidió llevar a cabo una serie de pruebas complementarias para determinar la técnica más adecuada para lograr la germinación de las esporas.

1. SIEMBRA DE ESPORAS EN RECIPIENTES PLÁSTICOS Y EN FRASCOS DE VIDRIO CON TRES TIPOS DE TAPA.

Aproximadamente 0,06 g de las esporas fueron sembradas en recipientes plásticos sin drenaje (3,78 l) que contenían uno de los siguientes sustratos: arena lavada y mantillo de hojas 1:1; arena lavada, mantillo de hojas e hidrogel 1:1:1; hidrogel solo y raíz de helecho triturada. De la misma manera fueron preparados nueve frascos de vidrio (500 ml), los cuales se llenaron con los sustratos antes mencionados, cerrando tres con tapas plásticas, tres con tapas de metal y tres con envoltura plástica transparente (Envoplast®). Los sustratos fueron previamente desinfectados con vapor de agua y humedecidos. Los recipientes plásticos se cubrieron con vidrios de 30 x 30 cm para evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos. Los dos tipos de envase usados, se colocaron bajo sombra artificial con tela de sarán, no hubo necesidad de riego dadas las condiciones herméticas de los recipientes.

2. SIEMBRA DE ESPORAS TRATADAS PREVIAMENTE POR REMOJO EN AGUA O POR ESCARIFICACIÓN CON ÁCIDO SULFÚRICO, EN FRASCOS HERMÉTICOS EN RECIPIENTES PLÁSTICOS.

Las esporas extraídas como en los experimentos anteriores fueron sometidas a los siguientes tratamientos de escarificación: inmersión por 5 min en ácido sulfúrico concentrado (neutralizado posteriormente en agua con cal), remojo por 24 h en agua destilada, desionizada y estéril. Aproximadamente 0,06 g de las esporas tratadas fueron sembradas en frascos de vidrio (tres frascos con esporas remojadas en agua y tres con esporas escarificadas en ácido sulfúrico) de 500 ml que contenían los sustratos previamente desinfectados con vapor de agua y humedecidos de forma adecuada. Los sustratos fueron: arena lavada y mantillo de hojas 1:1; arena lavada, mantillo de hojas e hidrogel 1:1:1; hidrogel. Los frascos se cerraron con tapas metálicas para evitar perturbar el desarrollo de los gametófitos. Los frascos se colocaron bajo sombra artificial con tela de sarán ($100\text{-}200\ \mu\text{M m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$). No hubo necesidad de riego dada la hermeticidad de los frascos. Adicionalmente fue empleado un recipiente plástico de 3,78 l sin drenaje, que contenía el sustrato arena lavada y mantillo de hojas 1:1 cubierto con una tapa de vidrio. Para la siembra de éste se usaron sólo las esporas remojadas por 24 h en agua.

3. SIEMBRA DE ESPORAS EN MACETA CON DRENAJE COLOCADA SOBRE BANDEJA CON AGUA.

Se tomaron unos 0,06 g de esporas y se sembraron en una maceta de arcilla cocida (3,78 l), que contenía una mezcla de arena lavada y tierra 2:1. El sustrato fue desinfectado luego de colocarlo en la maceta, aplicando en tres ocasiones

agua caliente (100°C) y tapando de inmediato. La tapa consistió de un vidrio de 30 x 30 cm. Este recipiente fue colocado sobre una bandeja plástica con agua, para que ésta ascendiera hasta las esporas por capilaridad, manteniéndose un alto nivel de humedad, dicha bandeja se llenó diariamente. La maceta así preparada fue colocada bajo la sombra de un árbol. Una vez germinados los gametófitos, se procedió a asperjar agua sobre los mismos para estimular su fertilización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los experimentos de propagación *in vivo* presentaron características que no permitieron el uso del análisis de la varianza, tales como la imposibilidad de realizar conteos del número de gametófitos y/o esporófitos en forma individual, ya que eran muy pequeños y germinaron en gran cantidad, por ello se contaron los frascos o bolsas que presentaron evidencia de germinación y el no cumplimiento de los supuestos para el análisis de la varianza (homocedasticidad, independencia de las observaciones, distribución normal, entre otros.).

EXPERIMENTO 1: SIEMBRA DE ESPORAS EN BOLSAS PLÁSTICAS CON DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES BAJO CÁMARA HÚMEDA (Figs. 1A y 1B).

Gran cantidad de esporas germinaron en los tratamientos T1, T2 y T4, correspondientes a turba y arena 1:1; mantillo de hojas y arena 1:1 y en arena respectivamente y bajo el ambiente de sombra artificial. El tiempo de aparición de los primeros gametófitos fue de tres semanas, luego de la siembra para todos los casos. A la tercera semana, en el T4 se observó el mayor número de bolsas plásticas con esporas germinadas, seguido por el T1 y el T2 (Tabla I). El T4 alcanzó germinación en el 100% de los envases antes que los tratamientos T1 y T2. En los envases con los tratamientos T1 y T2 germinaron todas las esporas contenidas en los envases luego de 9 semanas. En los tratamientos T5 (turba y arena 1:1), T6 (mantillo de hojas y arena 1:1) y T8 (arena) todos colocados bajo árboles, también germinaron las esporas, pero en cantidad menor a la observada para los tratamientos sembrados bajo sarán (Tabla I). En el sustrato arena se logró la mayor germinación y en el menor tiempo.

La germinación de las esporas fue mejor en todos los casos que la encontrada por Alzuru (2002) y Márquez (2003), debido a que la metodología empleada en esta investigación mantuvo niveles de humedad más altos y constantes y las esporas no fueron perturbadas.

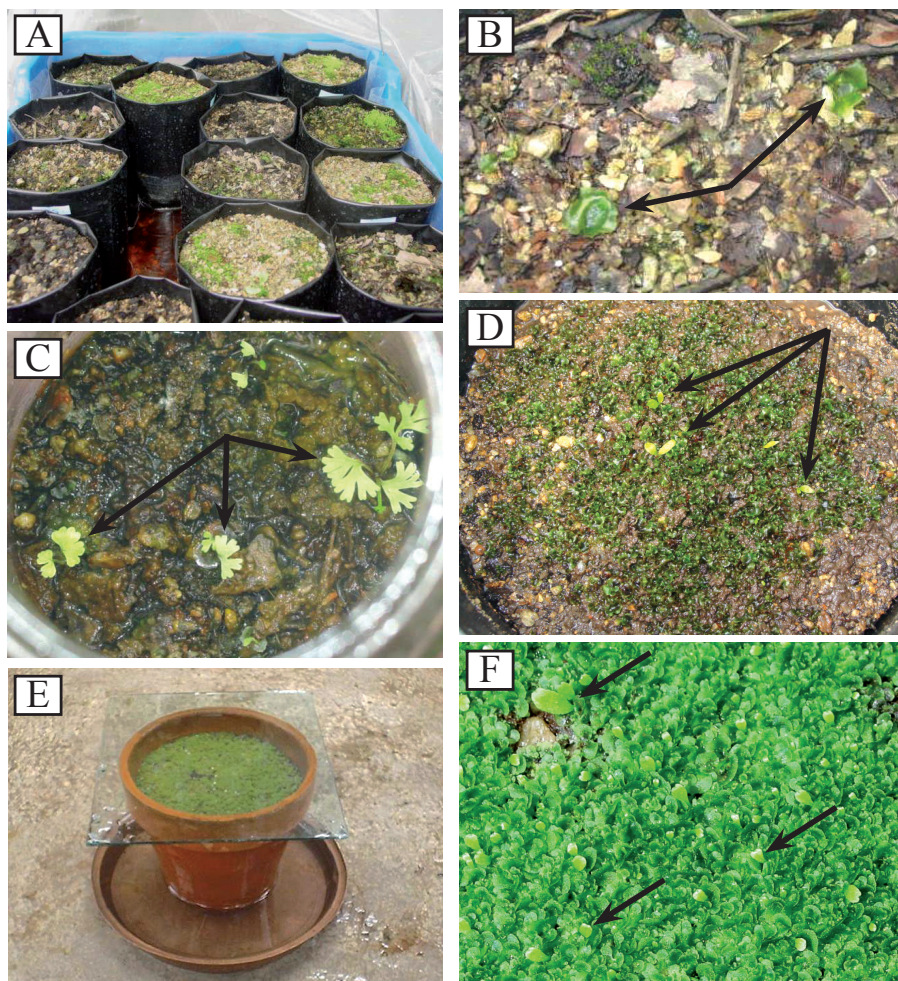


Fig. 1. Cultivo de esporas de *P. bifurcatum* en diversos sustratos, ambientes y técnicas de cultivo para obtener gametófitos y esporófitos. A y B. En bolsas plásticas bajo cámara húmeda, nótese la aparición de los gametófitos con su característica forma acorazonada (indicados con flechas). C. En frascos herméticos, nótese la aparición de helechos contaminantes (indicados con flechas). D. En recipiente plástico con tapa de vidrio y sin drenaje, nótese la gran cantidad de gametófitos y aparición de esporófitos (indicados con flechas). E y F. En maceta con drenaje y tapa de vidrio sobre bandeja con agua, nótese que los gametófitos cubren la superficie del sustrato y que aparecen gran cantidad de esporófitos (indicados con flechas).

Tabla I. Número de bolsas plásticas donde se observó formación de gametófitos tras cultivo *in vivo* de esporas de *P. bifurcatum* en diferentes sustratos y ambientes en bandejas bajo cámara húmeda durante 37 semanas.

Tiempo (Semanas)	Tratamientos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5	3	0	6	1	1	0	1
5	9	7	0	10	2	2	0	2
7	9	9	0	10	3	2	0	6
9	10	10	0	10	4	3	0	6
11	10	10	0	10	4	3	0	6
13	10	10	0	10	6	3	0	8
15	10	9	0	10	6	5	0	7
17	10	9	0	10	2	5	0	7
19	10	9	0	10	2	3	0	6
21	10	9	0	10	2	3	0	6
23	10	9	0	10	2	2	0	5
25	10	9	0	10	2	2	0	4
27	10	9	0	10	2	2	0	4
29	10	9	0	10	2	1	0	2
31	10	9	0	10	2	1	0	2
33	10	8	0	10	2	1	0	2
35	10	8	0	10	2	1	0	2
37	10	8	0	10	2	1	0	2

Tratamientos: T1 turba y arena 1:1 bajo sarán; T2 mantillo de hojas y arena 1:1 bajo sarán; T3 humus y arena 1:1 bajo sarán; T4 arena bajo sarán; T5 turba y arena 1:1 bajo árbol; T6 mantillo de hojas y arena 1:1 bajo árbol; T7 humus y arena 1:1 bajo árbol; T8 arena bajo árbol.

En todos los tratamientos se observó la presencia de musgos, algas y gametófitos de otros helechos, que compitieron fuertemente por nutrientes, espacio e iluminación. Por lo que, luego de una exitosa germinación inicial los gametófitos del helecho en estudio comenzaron a desaparecer, especialmente en el ambiente bajo la sombra natural de árboles, a diferencia de los tratamientos T1 y T4 que se mantuvieron vivos, durante las 37 semanas (Tabla I). Así mismo, fue observada la aparición de esporófitos de helechos contaminantes en la semana 12, en el ambiente de sombra artificial, lo que indica que la desinfección de las mezclas y medios con vapor de agua no fue suficiente para eliminar la totalidad de esporas de otros helechos.

EXPERIMENTO 2: SIEMBRA DE ESPORAS EN FRASCOS HERMÉTICOS CON DIFERENTES SUSTRATOS Y AMBIENTES.

Las esporas de los tratamientos T1 (turba y arena 1:1, bajo sarán), T3 (humus y arena 1:1, bajo sarán), T4 (arena, bajo sarán), T5 (turba y arena 1:1, bajo árbol), T7 (humus y arena, bajo árbol) y T8 (arena, bajo árbol) germinaron mayormente en la semana tres. Mientras que en los tratamientos T2 (mantillo de hojas y arena 1:1, bajo sarán) y T6 (mantillo de hojas y arena 1:1, bajo árbol) las esporas germinaron tardíamente, luego de la semana siete (Tabla II). La germinación de las esporas difirió poco entre los sustratos o los ambientes, a excepción del sustrato de turba y arena 1:1 que tuvo un número de frascos germinados en ambos ambientes ligeramente superior al resto. Así mismo, la germinación fue bastante similar y uniforme entre los diferentes sustratos bajo el mismo ambiente.

Luego de manifestarse una germinación inicial elevada en todos los tratamientos, a excepción del T2 y T6, hubo una tendencia general a la muerte y desaparición de los gametófitos en las semanas subsiguientes. La desinfección del sustrato no fue suficiente, ya que a partir de la cuarta semana se presentaron hongos y algas. El control de humedad fue deficiente (exceso de humedad en la superficie por condensación), probablemente debido a la hermeticidad de los recipientes.

Al igual que en el cultivo bajo cámara húmeda del experimento anterior, en este también se constató la presencia y desarrollo de otros helechos diferentes a *P. bifurcatum*, los que fueron evidentes en la semana siete (Fig 1C). En esta ocasión pudieron cuantificarse los esporófitos de otros helechos, llegando a sumar cinco en total, de los cuales cuatro estaban en un solo frasco con sustrato de mantillo de hojas y arena bajo tela de sarán y uno en un frasco con mantillo de hojas y arena bajo sombra natural de árbol.

Se observó una respuesta similar a la hallada por Borelli *et al.* (1990), quienes sembraron esporas en recipientes plásticos herméticos, llenos previamente con diferentes sustratos, obteniendo gran cantidad de contaminación por patógenos diversos y llegando a la conclusión de que el sustrato de raíz de helecho empleado por ellos fue mucho mejor que el resto de los sustratos utilizados, en tanto que mostró mayor germinación de gametófitos; sin embargo, estos investigadores no reportaron la aparición de helechos contaminantes.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS

1. SIEMBRA DE ESPORAS EN RECIPIENTES PLÁSTICOS Y EN FRASCOS DE VIDRIO CON TRES TIPOS DE TAPA.

En los frascos de vidrio con diferentes tipos de tapa no germinaron las esporas, pero sí hubo contaminación, mientras que germinaron en los recipientes plásticos, pero sólo en el sustrato de arena y mantillo de hojas 1:1 y en hidrogel. En este último, la germinación fue escasa y hubo un marcado desarrollo de algas. En el otro sustrato, los gametófitos llegaron a cubrir la superficie del mismo. Después de unos seis meses de sembradas las esporas, comenzaron a aparecer los esporófitos (Fig 1C). Estos resultados contradicen lo obtenido por Borelli *et al.* (1990) quienes no lograron propagar helechos de diferentes especies al usar recipientes plásticos y diferentes sustratos.

2. SIEMBRA DE ESPORAS TRATADAS PREVIAMENTE POR REMOJO EN AGUA O POR ESCARIFICACIÓN CON ÁCIDO SULFÚRICO EN FRASCOS HERMÉTICOS Y RECIPIENTES PLÁSTICOS.

No hubo evidencias de germinación de esporas en los frascos de vidrio en ninguno de los tratamientos realizados. Ésta se logró en el tratamiento de remojo en agua y siembra en recipientes plásticos en el sustrato de mantillo de hojas y arena 1:1. Luego de seis meses de cultivo hicieron aparición cuatro esporófitos. No obstante, hubo también una contaminación muy elevada, dejando ver la necesidad de emplear una forma de desinfección más eficiente, como la realizada por Jones (1994), quien recomienda aplicar agua caliente sobre el sustrato colocado en el envase a usar. Por otro lado, lo anterior luce más acertado que lo expuesto por Borelli *et al.* (1990) quienes esterilizaron sustratos en microondas o autoclaves, no logrando controlar la contaminación por estos métodos.

3. SIEMBRA DE ESPORAS EN MACETA CON DRENAJE COLOCADA SOBRE BANDEJA CON AGUA.

La germinación de esporas en esta prueba fue cuantiosa. Los gametófitos cubrieron completamente el sustrato llegando incluso a alargarse ligeramente, por lo que hubo sobrepoblación de los mismos; no se observó contaminación. La coloración de la masa gametofítica fue verde oscuro e intenso. A los cuatro meses aproximadamente comenzaron a aparecer los esporófitos en un número tan grande que se hizo imposible su contabilización (Figs. 1E y 1F). Esta tendencia coincide con los resultados señalados por Chin (1998) quien pudo propagar helechos fácilmente utilizando una metodología similar. De la misma

forma, en otro trabajo se concluye que al utilizar una bandeja con agua debajo de los envases plásticos, el agua asciende a las esporas por capilaridad, por lo que el control de la humedad es eficiente; las esporas quedan provistas de un ambiente de alta humedad en forma constante, y en el caso de que se condense agua en la cubierta, ésta puede caer y drenar hacia abajo (Plumbridge 1976).

Tabla II. Número de frascos donde se observó formación de gametófitos tras cultivo *in vivo* de esporas de *P. bifurcatum* en diferentes sustratos y ambientes durante 37 semanas.

Tiempo (Semanas)	Tratamientos							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	10	3	6	4	9	0	5	6
5	9	3	2	3	5	1	0	0
7	6	4	0	2	4	1	0	0
9	4	3	0	3	0	2	0	0
11	3	3	0	1	0	2	0	0
13	2	3	0	0	0	2	0	0
15	0	3	0	0	0	1	0	0
17	0	2	0	0	0	1	0	0
19	0	2	0	0	0	1	0	0
21	0	1	0	0	0	1	0	0
23	0	1	0	0	0	1	0	0
25	0	1	0	0	0	1	0	0
27	0	1	0	0	0	1	0	0
29	0	1	0	0	0	1	0	0
31	0	1	0	0	0	1	0	0
33	0	1	0	0	0	1	0	0
35	0	1	0	0	0	1	0	0
37	0	1	0	0	0	1	0	0

Tratamientos: T1 turba y arena 1:1 bajo sarán; T2 mantillo de hojas y arena 1:1 bajo sarán; T3 humus y arena 1:1 bajo sarán; T4 arena bajo sarán; T5 turba y arena 1:1 bajo árbol; T6 mantillo de hojas y arena 1:1 bajo árbol; T7 humus y arena 1:1 bajo árbol; T8 arena bajo árbol

CONCLUSIONES

1. La germinación de esporas se logró en el experimento realizado bajo cámara húmeda, obteniendo la mejor respuesta en los sustratos de turba y arena 1:1; mantillo de hojas y arena 1:1 y arena.
2. La siembra de esporas de *Platyserium bifurcatum* en frascos herméticos, aún cuando manifestó una importante germinación inicial, demostró ser poco efectiva.
3. En los frascos de vidrio con diferentes tipos de tapa no fue evidente la germinación de esporas de *Platyserium bifurcatum*. En los recipientes plásticos se logró la germinación en los sustratos de mantillo de hojas y arena 1:1 e hidrogel.
4. Los tratamientos de escarificación no favorecen la germinación de las esporas. En el tratamiento por remojo se obtuvo poca germinación y alta contaminación.
5. Las esporas germinaron en grandes cantidades cuando se empleó para su siembra una maceta con drenaje tapada con vidrio y colocada sobre bandeja con agua, logrando la producción de esporófitos en cuatro meses.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, por el financiamiento otorgado para la realización de esta investigación. A la TSU Angélica Chávez, por su dedicación durante la consecución del ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alzuru, B. J. 2002. Utilización de diferentes sustratos *in vivo* y de medios sólidos y líquidos *in vitro* para la germinación de esporas del helecho de cuero (*Rumohra adiantiformis* G. Forst Ching) y del helecho cacho de venado (*Platyserium bifurcatum* C. Chr.). Trabajo de grado. Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 88 p.
- Borelli, F., C. Castro, L. Mathes e A. Tambolato. 1990. Propagação de pteridófitas *in vitro* e *in vivo* a través de esporos. *Bragantia* 49: 205-219.

- Chin, W.Y. 1998. Ferns of the tropics. Timberpress. Portland, Oregon USA. 190 p.
- Constantino, C. 1995. Micropropagation from *Platycerium alcicorne* spores. *Colture Protette* 24: 79-81.
- Emmons, H. 1997. Propagating ferns from spores. *Horticulture* 94: 34-35.
- Hartman, H. y D. Kester. 1994. Propagación de plantas, principios y prácticas. Tercera reimpresión de la segunda edición. Editorial Continental. México. 759 p.
- Jones, J. 1994. Propagation: growing ferns from spores. 12 de noviembre 2011. Disponible en: http://www.bbg.org/gardening/article/growing_ferns_from_spores.
- Márquez, B.C. 2003. Propagación *in vitro* e *in vivo* del helecho cacho de venado (*Platycerium bifurcatum*). Trabajo de grado. Departamento de Agronomía. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 70 p.
- Plumbridge, J. 1976. How to propagate plants. Lothian. Melbourne, Australia. 214 p.