

Aclimatación de dos especies de helecho
propagadas *in vitro*:

Nephrolepis exaltata cv. *Bostoniensis*

(helecho bostoniensis). y

Nephrolepis cordigera

(helecho cola de quetzal)

Alvaro Francisco Castro Doomernik

MICROISIS:	_____
FECHA:	_____
ESTACIÓN:	_____

ZAMORANO

Departamento de Horticultura

Noviembre, 1999

987

**Aclimatación de dos especies de helecho
propagadas *in vitro*:
Nephrolepis exaltata cv *Bostoniensis*
(helecho bostoniensis) y
Nephrolepis cordigera
(helecho cola de quetzal)**

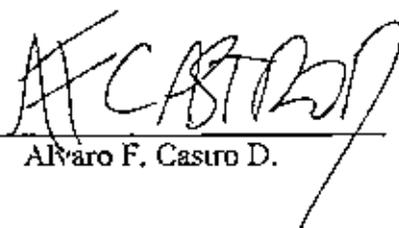
Proyecto especial como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por

Alvaro Francisco Castro Doomernik

Zamorano, Honduras
Noviembre, 1999

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.



Alvaro F. Castro D.

Zamorano, Honduras
Noviembre, 1999

DEDICATORIA

A nuestro Señor y Salvador Jesucristo que hizo posible este desarrollo de tesis.

A mis hermanos en Cristo Felipe, Gabriel, David, Mario, Gunther, Anita, Laura, Mauricio, Joche, Enrique, Elías y su familia, Tom y su familia, René y su familia, Eddy y su familia y a todo el Cuerpo.

A mis padres Angel y Luisa que me permitieron y apoyaron que estudiara en esta prestigiosa escuela y a mi único y querido hermano Sebastián.

A mis amigos Aléxis, Pierre, Ignacio, Enio, Juan, Marvin y Mildred.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores Dinie de Rueda, Fernando Fuentes y Mauricio Huete que hicieron posible la realización de este trabajo.

A las personas que asistieron directamente en la labor de la tesis Zoila y Erika.

A todos los profesores que compartieron su conocimiento durante los cuatro años de estudio en esta institución.

RESUMEN

Castro, Alvaro 1999. Aclimatación de dos especies de helecho propagadas *in vitro*: *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis (helecho bostoniensis) y *Nephrolepis cordigera* (helecho cola de quetzal) Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras 35p.

La micropropagación consiste en la producción masiva de plantas a partir de porciones pequeñas de una planta, utilizando técnicas de cultivo de tejidos y un sistema de producción *in vitro*, bajo condiciones estrictamente controladas de ambiente y nutrición. También se puede producir plantas a partir de los tejidos o células cultivadas asépticamente. El proceso de micropropagación consiste en varias etapas sucesivas y las tres primeras se llevan a cabo dentro del laboratorio. La última etapa del proceso es la etapa IV o de aclimatación que consiste básicamente en el trasplante de la vitroplanta del medio aséptico al ambiente de vida natural en el invernadero. Para que la planta sobreviva tiene que pasar por un período de aclimatación en el cual tiene que volverse autótrofa y tiene que desarrollar resistencia a la deshidratación. El estudio pretendió encontrar un protocolo claro y específico para el proceso de aclimatación de dos especies de helecho: *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis y *Nephrolepis cordigera*. En la primera parte del estudio se trabajó con *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis. Para esto se evaluaron cinco sustratos bajo un sistema de riego por nebulización: a) Compost, b) Compost mas arena, c) Corteza de coco, d) Corteza de coco mas arena y e) Fibra de coco. Se evaluó la sobrevivencia y características como número de brotes por planta, número de raíces por planta y la ganancia de peso por planta. En la segunda parte del estudio se trabajó con *Nephrolepis cordigera*. Bajo un sistema de microinvernadero, se evaluaron diferentes factores para "endurecer" las vitroplantas durante la etapa III antes de su trasplante al invernadero. Se evaluaron los siguientes factores: nivel de ácido abscísico (ABA), 0 mg/l, 2 mg/l y 4 mg/l, nivel de sacarosa 20g/l y 30g/l, y la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante. El sustrato que dió mejores resultados fue el compost, y el tratamiento en el cual hubo mayor ganancia de peso y mayor número de raíces fue en el que se utilizó ABA a razón de 2 mg/l.

Palabras claves: micropropagación, propagación *in vitro*, helechos, aclimatación, endurecimiento, ácido abscísico, autótrofa, enraizamiento.

NOTA DE PRENSA

SE OBTIENEN BUENOS RESULTADOS USANDO HORMONA ESTRESANTE PARA REDUCIR LA MORTALIDAD DEL HELECHO COLA DE QUETZAL CULTIVADO EN LABORATORIO

El helecho Cola de Quetzal cultivado en varios países latinoamericanos es de gran importancia económica en la industria de plantas ornamentales. Por esto varios laboratorios dedicados a producir plantas por medio de cultivo de tejidos están interesados en su producción. El cultivo de tejidos es la producción en masa de plantas obtenidas de una pequeña porción de una planta.

Entre los problemas encontrados en la producción del helecho Cola de Quetzal, cultivado en laboratorio, están los altos índices de mortalidad en el proceso de aclimatación al sacar las plantas del laboratorio al invernadero. En El Zamorano, se hicieron pruebas para mejorar la eficiencia en la aclimatación de este tipo de helecho, utilizando varias concentraciones de una hormona que hace mas soportable el estrés que sufren las plantas al transplantarlas al invernadero.

Esta hormona llamada ácido abscísico en el lenguaje técnico, produce una reacción en la planta facilitando su aclimatación en el invernadero. Por lo que al aplicarlo se obtienen plantas mejor preparadas para resistir las condiciones fuera del laboratorio.

Se probó las dosis de 2 miligramos por litro (mg/l) y 4 miligramos por litro (mg/l) de ácido abscísico, y se comparó con plantas a las que no se les aplicó la hormona. Se tuvo resultados favorables utilizando una concentración de 2 miligramos por litro, ya que estas plantas aumentaron de peso, tuvieron mayor número de raíces y no hubo ninguna pérdida por aclimatación en el invernadero, comparado con 0 miligramos por litro del testigo las cuales resultaron en menor peso y número de raíces.

CONTENIDO

Portada	i
Portadilla	ii
Autoría	iii
Páginas de firmas	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Nota de prensa	viii
Contenido	ix
Índice de cuadros	xí
Índice de anexos	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.2 General	3
1.1.3 Específicos	3
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. GENERALIDADES SOBRE EL HELECHO	4
2.2 PROPAGACION	4
2.3 ACLIMATACION	5
2.3.1 Cambios fisiológicos	6
2.3.1.1 Cera epicuticular de la hoja	6
2.3.1.2 Ajuste osmótico	6
2.3.1.3 Comportamiento de los estomas	7
2.3.1.4 Fotosíntesis	7
2.3.2 Cambios anatómicos	7
2.3.2.1 Hoja	7
2.3.3 Intensidad lumínica	8
2.3.4 Humedad	8
2.3.5 Temperatura	8
2.4 ANTECEDENTES EN LA UTILIZACION DE ACIDO ABSCÍSICO (ABA)	8
2.4.1 Efectos	9
3. MATERIALES Y METODOS	10
3.1 DESCRIPCION GEOGRAFICA	10
3.2 CARACTERISTICAS DEL AREA DE ESTUDIO	10
3.3 SELECCION DEL SITIO	10
3.4 ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO	10
3.4.1 Parte I	10
3.4.1.1 Preparación y esterilización de los substratos	11
3.4.1.2 Distribución y llenado de bandejas	12
3.4.2 Parte II	12
3.4.2.1 Procedimiento utilizado para la transferencia de las vitroplantas de etapa II a etapa III en el laboratorio	14
3.4.2.2 Esterilización del substrato utilizado en el invernadero	14
3.4.2.3 Construcción de microinvernaderos	15

4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	16
4.1 PARTE I.....	16
4.1.1 Número de estolones.....	16
4.1.2 Número de brotes.....	16
4.1.3 Número de raíces.....	17
4.2 PARTE II.....	17
4.2.1 Ganancia de peso.....	17
4.2.2 Número de brotes.....	18
4.2.3 Número de raíces.....	19
5. CONCLUSIONES.....	21
6. RECOMENDACIONES.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	23
8. ANEXOS.....	24

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Cuadro 1. Distribución de los cinco sustratos en la bandeja tipo Pro Trays™ 12
2. Cuadro 2. Número de estolones, brotes y raíces emitidos luego de probar cinco tipos de sustratos en la aclimatación de *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis, El Zamorano, Honduras 1999..... 17
3. Cuadro 3. Análisis de varianza sobre la ganancia de peso promedio por planta en la aclimatación de *Nephrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999..... 18
4. Cuadro 4. Análisis de varianza sobre número de brotes promedio por planta en la aclimatación de *Nephrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999..... 19
5. Cuadro 5. Análisis de varianza sobre el número de raíces promedio por planta en la aclimatación de *Nephrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999..... 20
6. Cuadro 6. Valores promedio y desviaciones estándar para ganancia de peso, número de brotes y número de raíces promedio por planta en la aclimatación de *Nephrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999..... 20

INDICE DE ANEXOS

Anexos

1. Anexo 1. Protocolo y medios de crecimiento utilizados en las diferentes etapas de micropropagación para *Nephrolepis cordigera* (helecho Cola de Quetzal) y *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis (helecho Bostoniensis) en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, El Zamorano, Honduras. 25
2. Anexo 2. Formulación Básica de sales minerales y complementos orgánicos de Murashige y Skoog (MS)..... 27
3. Anexo 3. Soluciones madre de sales minerales de Murashige y Skoog (MS) utilizadas en la preparación de los medios de crecimiento para las diferentes etapas en la micropropagación de los helechos *Nephrolepis. exaltata* cv. Bostoniensis y *N. cordigera*..... 28
4. Anexo 4. Datos recolectados en la transferencia de etapa III a etapa IV de vitroplantas de *Nephrolepis cordigera* (helecho cola de quetzal) como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999..... 29
5. Anexo 5. Efecto de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre la ganancia de peso promedio (g) por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999..... 31
6. Anexo 6. Efecto de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de brotes promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999..... 32
7. Anexo 7. Efecto de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de raíces promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999..... 33
8. Anexo 8. Efecto de las interacciones de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre la ganancia de peso promedio (g) por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999..... 34
9. Anexo 9. Efecto de las interacciones de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de brotes promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999.. 35

10. Anexo 10. Efecto de las interacciones de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de raíces promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999, 36

1. INTRODUCCION

El avance de la agricultura, desde sus inicios hasta hoy, ha alcanzado niveles muy elevados que permiten desde una gran tecnificación en el campo, hasta la propagación y desarrollo de nuevas plantas a partir de porciones muy pequeñas en un medio artificial. A estas técnicas se les conoce como cultivos *in vitro* o cultivo de tejidos, las cuales se realizan en laboratorios especializados de agricultura moderna.

La micropropagación consiste en la producción masiva de plantas a partir de partes pequeñas, usando un sistema de producción *in vitro*. Este tipo de propagación nos permite producir plantas a partir de tejidos o células cultivadas asépticamente, bajo condiciones estrictamente controladas de ambiente y nutrición.

Según Usui et al. (1996), la técnica de cultivo de tejidos se puede definir como el cultivo de células u órganos extraídos de las plantas, que se mantienen bajo condiciones artificiales y permite reproducir plantas que poseen todas las características de la planta madre.

El proceso de micropropagación consiste en cuatro etapas y para efectos de este estudio se trabajó con las dos últimas etapas del proceso. La etapa I o de establecimiento tiene por objetivo establecer el cultivo en un medio nutritivo estéril. La selección del explante, la eliminación de contaminantes y las condiciones de cultivo son factores claves del éxito en la etapa de establecimiento.

En la etapa II o de multiplicación se incrementa el número de propágulos para su posterior enraizamiento en un nuevo medio nutritivo. Según Hartmann y Kester (1997), el éxito de la multiplicación radica en que se produzcan plantas uniformes sin enraizar, del tamaño apropiado, que se recuperen con prontitud después de su transferencia y que empiecen a crecer de inmediato.

En la etapa III o de pretransplante se prepara a las plantas para su transplante y establecimiento fuera del medio artificial. Este periodo tiene un lapso de dos a cuatro semanas para permitir que se desarrollen las raíces.

La última etapa del proceso de micropropagación es la aclimatación o etapa IV. Esta etapa consiste básicamente en el transplante de las vitroplantas del medio aséptico al ambiente de vida natural en el invernadero. Para que la planta sobreviva tiene que pasar por un periodo de aclimatación en el cual tiene que volverse autótrofa, tiene que desarrollar raíces, resistencia a deshidratación y resistencia a patógenos. En esta etapa es

de suma importancia el mantenimiento de una humedad relativa elevada para que las plantas no se deshidraten y se puedan desarrollar nuevas raíces y brotes.

En el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de El Zamorano, se ha trabajado en el desarrollo de protocolos para la propagación *in vitro* de helechos. A través de estos trabajos se han desarrollado las formulaciones específicas para estas especies dependiendo de la etapa en el proceso de micropropagación. Actualmente se trabaja con dos especies de helecho *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis* (Helecho *Bostoniensis* o Boston Fern) y *Nephrolepis cordigera* (Helecho Cola de Quetzal).

En el caso de los helechos, las vitroplantas deben contar con un buen sistema radical, producto de las formulaciones a que han sido expuestas en la etapa III de laboratorio, antes de salir al invernadero. La limitante principal de estas especies es que sufren un grado muy elevado de deshidratación al salir del laboratorio, no desarrollan buena cantidad de brotes ni follaje y por lo tanto la pérdida de vitroplantas es bastante alta. El grado de deshidratación que se ha observado es mayor en *Nephrolepis cordigera* que en *Nephrolepis exaltata*, por lo tanto la mortalidad ha sido mayor para esta última especie.

A través de este ensayo se pretende establecer un protocolo de aclimatación para las dos especies de helechos, de manera que se reduzca la mortalidad por deshidratación y pérdida de vigor de las vitroplantas.

En la primera parte de este estudio se trabajó con *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis*. Se probaron los siguientes cinco tipos de sustrato bajo un sistema de riego por nebulización:

1. Compost.
2. Corteza de coco.
3. Fibra de coco.
4. Mezcla de compost y arena (1:1).
5. Mezcla de corteza de coco y arena (1:1).

En la segunda parte de este estudio se trabajó con *Nephrolepis cordigera*. El propósito de la segunda parte de este estudio fue comenzar a aclimatar las vitroplantas o a "endurecerlas" desde que las mismas están todavía en el laboratorio en etapa III.

Para lograr este endurecimiento en etapa III se evaluaron las siguientes variables:

1. El nivel de sacarosa en el medio de crecimiento en etapa III.
2. El uso de varios niveles del regulador de crecimiento ABA (ácido abscísico) en el medio de crecimiento en etapa III.
3. La remoción o retención de parafilm en los últimos días del proceso *in vitro* inmediatamente antes de la salida de las vitroplantas al invernadero.

1.1 OBJETIVOS

Los objetivos de esta investigación fueron los siguientes:

1.1.2 General

1. Evaluar y definir un método específico para el proceso de aclimatación de las especies de helecho *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis* y *Nephrolepis cordigera*.

1.1.3 Específicos

1. Encontrar un sistema de aclimatación óptimo para las especies de helecho.
2. Encontrar un sustrato adecuado para poder llevar a cabo la aclimatación de las especies de helecho.
3. Establecer y definir las condiciones óptimas para disminuir la deshidratación y estimular el desarrollo del follaje al trasladar las vitroplantas al invernadero.
4. Acortar el tiempo de adaptación en la etapa IV.
5. Definir la influencia de la aplicación de tratamientos en la etapa III, para acelerar y optimizar el "endurecimiento" de las vitroplantas antes de su traslado al invernadero.
6. Usar tratamientos pre-endurecimiento como la hormona ácido abscísico en tres diferentes dosis, uso de sacarosa en dos diferentes dosis en el proceso de aclimatación y remoción de papel parafilm.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES SOBRE EL HELECHO

Erróneamente damos el nombre de helecho a todas las plantas que no tienen flores ni frutos; pero si las estudiamos y conocemos algo de su morfología y taxonomía, nos damos cuenta que los verdaderos helechos están incluidos entre las plantas más numerosas y comunes. Entre las clases de estos se ha reportado especies con valor alimenticio y medicinal (Murillo, 1983).

Viven actualmente unas 9000 especies de helechos ampliamente distribuidas en los trópicos y en las regiones templadas. Los de regiones templadas prefieren lugares frescos húmedos y sombreados. Algunos helechos miden hasta 16 metros, con hojas hasta de 4 metros (Villegas, 1996). *Nephrolepis* es un género subtropical de aproximadamente 30 especies, con nueve de ellas ubicadas en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo. (Gerrit et al., 1995).

Nephrolepis exaltata cv. *Bostoniensis* tiene un rizoma perenne, bien desarrollado; escamas patentes, pardo pálido a oscuro, a veces rojizas, esencialmente concoloras; tubérculos ausentes. Las hojas pueden llegar a medir de 40-142 cm por 5-12 cm y son de color verde (Gerrit et al., 1995).

Nephrolepis cordigera es un helecho que tiene un rizoma perenne, bien desarrollado; escamas patentes, pardo pálido a oscuro, a veces negras, concoloras; tubérculos ausentes. Las hojas pueden llegar a medir de 14-31 cm por 1-6 cm (Gerrit et al., 1995).

2.2 PROPAGACION

Muchos géneros y especies de helechos se propagan en forma convencional por medio de esporas. Hartmann y Kester (1997) describen en forma detallada un método eficiente para poder propagar algunas especies de helechos a partir de la germinación de esporas. También se han desarrollado procedimientos para propagar helechos *in vitro* a partir de esporas usando una solución nutriente en agar.

En el caso del helecho de Boston o Helecho *Bostoniensis*, es una planta híbrida que no produce esporas viables y se propaga con lentitud por división de corona, pero es una de las plantas más adaptables a la micropropagación y se puede propagar con tasas elevadas (Hartmann y Kester, 1997). Probablemente el helecho de Boston se propaga más por medio de cultivo de tejidos que cualquier otra planta ornamental (Kytte, 1996).

Con respecto al helecho Cola de Quetzal, se puede propagar en forma convencional: a) por división de corona, pero el número de plantas que se obtiene por éste método es muy bajo como sucede con el helecho de Boston (Espinal, 1999)¹; y b) por esporas, pero aún cuando el número de plantas que se obtiene es mayor que con el método anterior, este método es demorado. En cuanto a la propagación *in vitro* del helecho Cola de Quetzal no se ha encontrado en la literatura información alguna que haga referencia a esta forma de propagación. Espinal y Alán (1997) reportan los primeros trabajos preliminares para propagar el helecho Cola de Quetzal en el laboratorio obteniendo altas tasas de multiplicación.

En general los helechos son propagados *in vitro* por medio de segmentos de rizoma (Kyte, 1996). Se pueden utilizar las puntas de rizomas en crecimiento activo según recomienda Burr, 1975 (citado por Hartmann y Kester, 1997) o de estolones como lo cita Kyte, 1996. Para la multiplicación *in vitro* de los helechos, es preferible mantener las plantas madre en el invernadero en macetas colgantes y bajo un sistema de riego por goteo (Hartmann y Kester, 1997). Según Espinal y Alán (1997) es posible obtener explantes relativamente limpios, con bajo grado de contaminación superficial, si los rizomas son obtenidos de plantas madre que están creciendo en macetas colgantes.

La ventaja del cultivo de tejidos para propagar los helechos es que por medio del uso de esta técnica se pueden obtener no solamente una cantidad masiva de plantas, sino que también éstas son más sanas, más uniformes y de mejor apariencia que aquéllas propagadas por los métodos convencionales de propagación. Con un período de producción aproximado de menos de cuatro meses al año se pueden obtener millones de plantas al año, sistema que puede estar al alcance de cualquier facilidad dedicada a la micropropagación, por muy modesta que sea (Kyte, 1996). Burr, 1975 (citado por Espinal y Alán, 1997), reporta que es posible producir 37,500 plantas a partir de 100 segmentos de rizoma en un período de nueve meses.

Una limitante que existe para la producción de helechos *in vitro* es que la variabilidad genética de las plantas producidas se incrementa con el número de subcultivos. Para reducir esta variabilidad se recomienda realizar solamente tres a cuatro subcultivos (Espinal y Alán, 1997).

2.3 ACUMULACION

Una de las etapas que reviste gran importancia dentro de la técnica de propagación *in vitro* es el trasplante de las vitroplantas al invernadero, así como la adaptación de éstas al medio ambiente. Varios factores deben ser considerados para la aclimatación de vitroplantas al medio ambiente ya que las condiciones difieren mucho en la fase de laboratorio, invernadero y campo; por lo tanto, se hace necesario un tratamiento de aclimatación para evitar la pérdida de propágulos al ser trasplantados al invernadero (Hurtado y Merino, 1987).

¹ Comunicación personal. El helecho bostoninensis. El Zamorano, Honduras

Para aclimatar las vitroplantas se requiere de un sistema cerrado al medio ambiente exterior como un invernadero (Usui et al., 1996) ya que en el campo las plantas son susceptibles a daños causados por el clima, ataque de insectos y enfermedades. En el invernadero se deben controlar factores como la obscuridad (intensidad lumínica), humedad relativa y la temperatura (Usui et al., 1996).

El éxito en el cultivo de tejidos depende de la habilidad de transferir y restablecer cultivos vigorosos de plantas *in vitro* a condiciones *ex vitro*. Esto implica la aclimatación o el endurecimiento de las plantas a condiciones de baja humedad relativa y alta intensidad lumínica. En el proceso de aclimatación, las vitroplantas experimentan cambios en la anatomía de las hojas (Capellades et al., 1990, citado por Colón et al., 1996) y en la fisiología (Grout y Millam 1985, citado por Colón et al., 1996); estos confieren a las vitroplantas un gran potencial de supervivencia *ex vitro*.

Las modificaciones en el desarrollo de las hojas y la competencia fotosintética, que ocurren cuando las plantas son trasladadas de un ambiente *in vitro* a un ambiente *ex vitro*, son inducidas por los altos niveles de luz y bajos porcentajes de humedad relativa; estos factores crean modificaciones anatómicas de la cera epicuticular foliar, los estomas y de las células epidermales, parecidas a las que se producen en la aclimatación de invernaderos que cultivan plantas (Capellades et al., 1990, citado por Colón et al., 1996).

2.3.1 Cambios fisiológicos

Según Colón y Rodríguez (1996) las vitroplantas pueden desarrollar y mostrar cambios fisiológicos que le permiten tolerar condiciones adversas de deficiencias de humedad. A continuación se presentan algunos aspectos de los procesos fisiológicos afectados por una disminución en la humedad al transplantar las vitroplantas al invernadero:

2.3.1.1 Cera epicuticular de la hoja. Normalmente las vitroplantas sufren de una pérdida excesiva de agua; esta condición se relaciona con la falta de cera epicuticular además de que los estomas aun no están funcionando con normalidad. Eventualmente, las plantas van desarrollando una cutícula gruesa o cerosa que reduce las pérdidas de agua.

2.3.1.2 Ajuste osmótico. Debido a que las vitroplantas no son autosuficientes en condiciones *in vitro*, tienden a perder agua y por lo tanto pierden turgencia al momento de trasladarlas al invernadero. Es importante mantener la turgencia de las plantas, ya que es esencial para el alargamiento celular y para el crecimiento. Cuando la planta es autosuficiente puede hidrolizar compuestos insolubles (almidón) a compuestos solubles (azúcares) y de esta manera hace que el potencial hídrico de la savia sea más negativo (Colón y Rodríguez, 1996) y se mantenga la turgencia.

2.3.1.3 Comportamiento de los estomas. El potencial hídrico, al cual responden los estomas, está afectado por una variedad de factores entre los cuales están la edad de la planta, las condiciones de crecimiento, la ubicación de la hoja y los antecedentes de influencia hídrica de la planta.

Las vitroplantas al salir del laboratorio no tienen un estoma funcional por lo que pierden agua con facilidad, siendo necesario introducirlas en un ambiente con alta humedad relativa como lo es un invernadero.

2.3.1.4 Fotosíntesis. Normalmente las plantas *in vitro* requieren de una fuente externa de energía ya que son heterotróficas, no fotosintetizan por lo tanto no son autosuficientes (Colón y Rodríguez, 1996). Luego de aproximadamente diez días posteriores al trasplante, las vitroplantas inician normalmente sus procesos fotosintéticos.

2.3.2 Cambios anatómicos

2.3.2.1 Hoja. Según Colón y Rodríguez (1996): "la apariencia y anatomía de las hojas típicas reflejan su capacidad para el intercambio gaseoso y la absorción de la radiación. Una estructura que absorba la radiación necesita ser ancha y delgada, y orientarse en ángulos rectos hacia la fuente de radiación para alcanzar su máxima eficiencia. Del mismo modo, para el intercambio de gases eficiente se requiere una lámina delgada que ofrezca el máximo área foliar por unidad de peso. Sin embargo, un intercambiador de gases que es eficaz es también un evaporador eficiente, por lo cual una estructura en forma de hoja sin ninguna cubierta protectora se secaría rápidamente. La epidermis con su cutícula protege a la hoja de la deshidratación, pero también reduce el intercambio gaseoso a niveles muy bajos".

El objetivo de la aclimatación es obtener el mayor número de plantas aclimatadas lo más temprano posible. Las vitroplantas, luego de ser aclimatadas ya están en la capacidad de orientarse hacia la fuente de luz para alcanzar su máxima eficiencia.

Según Colón y Rodríguez (1996) las hojas se adaptan de diversas maneras a condiciones ambientales particulares, por lo cual en plantas normales se pueden producir amplias variaciones. En cuanto a las vitrohojas este proceso es más complicado debido a las condiciones de alta humedad relativa en que se encontraba la planta en el interior del tubo de ensayo. Como ya se mencionó, las hojas producidas *in vitro* no tienen estomas funcionales pero a través del tiempo estos se van modificando hasta llegar a ser funcionales. Las modificaciones incluyen una diversidad de mecanismos que reducen la pérdida de agua en las plantas tales como pelos superficiales, estomas hundidos, capa cerosa, etc.

2.3.3 Intensidad lumínica

Mientras está en condiciones *in vitro* la actividad fotosintética no es necesaria ya que la planta tiene todos sus nutrientes del medio de crecimiento (Hurtado y Merino, 1987). Al trasladar las vitroplantas al invernadero se establece la actividad fotosintética por lo que la intensidad lumínica debe ser incrementada gradualmente. Este incremento debe ser gradual ya que una exposición directa al sol resulta en un estrés tan fuerte que la planta no sobreviviría a este cambio.

2.3.4 Humedad

Según Hurtado y Merino (1987) la planta dentro del tubo de ensayo se encuentra bajo condiciones de esterilidad y de alta humedad relativa (98-99,5%). Es posible reducir gradualmente la humedad relativa dentro del contenedor eliminando la cinta de parafilm unos cinco días antes del trasplante al suelo; esto dará a la vitroplanta mayor tolerancia a la baja humedad relativa del medio ambiente y se facilitará su posterior adaptación a condiciones autótroficas. El objetivo final es inducir a que las vitroplantas puedan regular adecuadamente sus procesos de absorción, translocación y transpiración de agua.

El porcentaje de humedad relativa en el invernadero es importante para el éxito en la aclimatación de las plántulas. Por lo cual el mantenimiento de una elevada humedad relativa (80 al 100%) durante dos a tres semanas posterior al trasplante sirve para proteger la planta de la desecación y permitir que inicie nuevas raíces y brotes (Hartmann y Kester, 1997).

Aún cuando los procesos de aclimatación sean bien realizados, la sobrevivencia de las plantas en el trasplante puede ser baja debido a la inhabilidad de las plantas de retener agua en sus tejidos (Grout y Aston, 1978, citado por Colón et al., 1996).

2.3.5 Temperatura

La temperatura adecuada para la aclimatación en el invernadero es de 20 a 25 °C. Temperaturas mayores a esta causan daños por deshidratación siendo necesario tener una adecuada ventilación (Usui et al., 1996).

2.4 ANTECEDENTES EN LA UTILIZACION DE ACIDO ABCÍSICO (ABA)

Según Colón y Rodríguez (1996) el ácido abscísico (ABA) se utiliza para reducir las tasas de crecimiento y para moderar los efectos de las citocininas y auxinas.

El ABA se le conoce comúnmente como una fitohormona de estrés que se sintetiza a partir del ácido mavalónico en hojas maduras como respuesta al estrés hídrico. Además las semillas son una fuente ricas en ABA (Colón y Rodríguez, 1996).

Esta fitohormona se transporta desde las hojas a otros puntos de crecimiento a través del floema. Además existe cierta evidencia de que puede circular a las raíces y luego regresar a las hojas a través del xilema (Colón y Rodríguez, 1996).

2.4.1 Efectos

Según Colón y Rodríguez (1996) los efectos que posee el ABA son los siguientes:

1. Un estrés hídrico causa aumento en ABA y esto resulta en el cierre del poro estomatal.
2. El ABA estimula el transporte de fotoasimilados hacia las semillas en desarrollo.
3. El ABA induce la síntesis de proteínas de almacenamiento en semillas.

La iniciación de cambios similares en patrones evolucionarios de las hojas luego del tratamiento de ácido abscísico (ABA) *in vivo* (Zeevaart y Creelman, 1988, citado por Colón et al., 1996) e *in vitro* (Jarret y Gawel, 1991; Kane y Albert, 1989, citado por Colón et al., 1996) sugieren un posible rol de desarrollo interno de ABA en el proceso de aclimatación.

En un previo estudio, Colón et al. (1990) reportó que plántulas de *Arbutia arbuntifolia* (Rosaceae) cultivadas *in vitro* en la presencia de ABA, produjeron hojas con rasgos morfológicos y anatómicos similares a aquéllos producidos por plantas crecidas y desarrolladas directamente en invernaderos.

Según Colón et al. (1996) posiblemente una suplementación media con ABA en la fase III puede servir como un tratamiento *in vitro* de pre-endurecimiento para inducir desarrollos y cambios fisiológicos prematuramente, los cuales disminuyen la pérdida de agua, incrementan la capacidad fotosintética y así incrementan la habilidad de la vitroplanta para sobrevivir en un ambiente *ex vitro*.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 DESCRIPCION GEOGRAFICA

El estudio se llevó a cabo en los Departamentos de Horticultura y Agronomía de la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, ubicada en el Km. 30 de Tegucigalpa, en el valle del río Yeguaré, en el Departamento de Francisco Morazán, Honduras, durante el periodo de marzo a diciembre de 1999.

3.2 CARACTERISTICAS DEL AREA DE ESTUDIO

El sitio de la investigación se encuentra a una altura de 800 msnm, con una estación lluviosa comprendida de mayo a octubre y una estación seca de noviembre a abril. La temperatura oscila de 20-24°C respectivamente y con una intensidad de luz promedio, durante el día, de 7,000 a 10,000 pies candela.

3.3 SELECCION DEL SITIO

El sitio seleccionado fue el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, juntamente con sus invernaderos de aclimatación ubicados en el Departamento de Agronomía, y los invernaderos del Departamento de Horticultura ubicados en la Sección de Propagación de Plantas.

3.4 ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO

3.4.1 Parte I

La primera parte de esta investigación se llevó a cabo en el Departamento de Horticultura y consistió en el trasplante del helecho *Nephrolepis exaltata* cv. Bostoniensis a un invernadero de vidrio, bajo un sistema de riego por nebulización automatizado por un reloj eléctrico que se puede calibrar. El reloj fue calibrado para que el sistema de nebulización se encendiera a las seis de la mañana y se apagara a las seis de la tarde. El intervalo de riego fue de 20 segundos cada seis minutos durante el periodo de 12 horas durante el día que se mantuvo encendido el sistema.

El sistema se apagó a las seis de la tarde debido a que durante la noche la temperatura baja en el invernadero reduciéndose la tasa de transpiración por parte de la planta.

También al reducirse el exceso de agua que reciben las plantas se reduce la pérdida por pudrición en las raíces y la contaminación por hongos. El trasplante se realizó el 7 de abril de 1999.

En este experimento se probaron diferentes sustratos con el propósito de determinar el mejor para aclimatación. Para realizar la prueba se utilizó el modelo estadístico Diseño Completo al Azar (DCA) ya que no se visualizó ninguna gradiente que afectara los tratamientos. El modelo constó de cinco tratamientos y cinco repeticiones. Cada unidad experimental tenía un total de cinco plantas. Los tratamientos a utilizarse fueron los siguientes:

- Compost.
- Compost y arena.
- Corteza de coco.
- Corteza de coco y arena.
- Fibra de coco.

Las variables tomadas fueron: al momento del trasplante se contó el número de raíces inicial y al momento de la cosecha se contó el número de raíces final, brotes nuevos y estolones.

En el anexo 1 se ilustra el protocolo utilizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación de Zamorano para la propagación *in vitro* de las vitroplantas de helecho *N. Exaltata* cv. *Bostoniensis* que se utilizaron en esta investigación. En el anexo 2 se presenta la formulación base de Murashige y Skoog que se utilizó en la preparación de los medios de cultivo utilizados para las diferentes etapas en la micropropagación de helecho. El anexo 3 ilustra las formulaciones utilizadas en la preparación de las diferentes concentraciones de las soluciones madre de sales minerales MS que se utilizaron en la preparación de los medios de crecimiento.

Una vez finalizado el experimento se procedió a tabular los datos y analizarlos en el programa estadístico MSTAT-L desarrollado en la Universidad de Michigan.

3.4.1.1 Preparación y esterilización de los sustratos. Los sustratos de crecimiento (compost, corteza de coco, fibra de coco y arena) se empacaron en paquetes de papel manila y se introdujeron en un autoclave a una temperatura de 120 °C durante 15 minutos con el fin de esterilizar los medios. Luego se prepararon cuatro bandejas de 50 celdas, en las cuales se colocó los diferentes sustratos de crecimiento con el objetivo de observar en cual se adaptaban mejor las vitroplantas. Seguidamente se procedió a preparar las dos mezclas de medios que se utilizarían también como sustratos y que consistieron en una mezcla de compost más arena y corteza de coco más arena, ambos en una relación de volumen de uno a uno (50:50). Las bandejas que se utilizaron fueron de poliestireno, Pro Trays™ de 50 celdas, con una profundidad de 2 1/4 pulgadas de profundidad (Hummert International, U.S.A.).

3.4.1.2 **Distribución y llenado de bandejas.** Una vez esterilizados los substratos a utilizar se procedió a introducirlos en las bandejas, en cada una de las celdas. Previo a la introducción de los mismos se humedecieron con el fin de facilitar la mezcla mecánica de los substratos (compost más arena y corteza de coco más arena) y reducir el estrés de las plantas por falta de agua.

La colocación de los substratos en las bandejas se esquematiza en el cuadro 1. Tomando la primera bandeja de izquierda a derecha y escogiendo las primeras cinco celdas hacia abajo se colocó el compost (C). Luego saltando una fila se tomó las siguientes cinco celdas hacia abajo y se colocó la corteza de coco (CC). Para el siguiente substrato se volvió a saltar una fila y las siguientes cinco celdas hacia abajo se colocó la fibra de coco (FC) y a así se hizo con el resto de substratos compost más arena (C+A) y la corteza más arena (CC+A) como se puede apreciar en el cuadro 1. Sucesivamente se alternó al azar cada substrato en las restantes cuatro bandejas.

Cuadro 1. Distribución de los cinco substratos en la bandeja tipo Pro Trays™

C		CC		FC		C+A		CC+A	
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Una vez colocados y humedecidos los substratos en las bandejas se procedió al trasplante de los helechos, del tubo de ensayo (etapa III) a las bandejas. Para esto, se procedió a dividir las plántulas del helecho *Bostomiensis*, dos vitroplantas por cada tubo en ensayo, se lavó el agar de la base de las plantas, y luego se procedió a sembrarlas en las bandejas. En el trasplante se utilizó pinzas para extraer las plántulas y luego con un bisturí se procedió a dividir las por la mitad. Todo este procedimiento se realizó bajo el nebulizador en funcionamiento con el fin de reducir el estrés de las plantas y su posterior pérdida de agua.

3.4.2 Parte II

La segunda parte de este experimento se llevó a cabo en el Departamento de Agronomía y consistió en el trasplante del helecho *Nephtrolepis cordigera* (helecho Cola de Quetzal) a un microinvernadero de plástico utilizando el substrato (compost) que dió mejores resultados en la primera parte de esta investigación.

El propósito de esta segunda parte de la investigación fue exponer las vitroplantas a diferentes tratamientos de pre-aclimatación o endurecimiento durante la etapa III antes de su trasplante al invernadero. Además de remover o dejar el parafilm antes del trasplante, se probaron diferentes dosis de la hormona ácido (ABA) y de sacarosa para determinar la dosis más adecuada para el endurecimiento de los helechos. Todos estos tratamientos se hicieron mientras las vitroplántulas se encontraban en el tubo de ensayo.

Se utilizó el modelo estadístico Bloques Completos al Azar (BCA) con un diseño triple factorial. El modelo constó de doce tratamientos (3 dosis de ABA x 2 dosis de sacarosa x 2 niveles de parafilm) y cinco repeticiones, cada unidad experimental tenía cinco plantas. Para el diseño triple factorial se analizó tres efectos principales con sus respectivas combinaciones de los niveles de los factores investigados. A continuación se detallan los efectos principales y sus interacciones:

1. Acido abscísico (0 mg/l, 2 mg/l y 4 mg/l).
2. Sacarosa (20 g/L y 30 g/L)
3. Parafilm (remoción vs. no remoción).
4. ABA x Sacarosa.
5. Parafilm x Sacarosa.
6. ABA x parafilm.
7. ABA x parafilm x Sacarosa.

Previo a la siembra se hizo una distribución al azar de los tratamientos en la bandeja. A continuación se muestra los diferentes tratamientos individuales:

1. 0 mg/l ABA, 30 g/L Sacarosa, con el parafilm.
2. 0 mg/l ABA, 30 g/L Sacarosa, sin el parafilm.
3. 0 mg/l ABA, 20 g/L Sacarosa, con el parafilm.
4. 0 mg/l ABA, 20 g/L Sacarosa, sin el parafilm.
5. 2 mg/l ABA, 30 g/L Sacarosa, con el parafilm.
6. 2 mg/l ABA, 30 g/L Sacarosa, sin el parafilm.
7. 2 mg/l ABA, 20 g/L Sacarosa, con el parafilm.
8. 2 mg/l ABA, 20 g/L Sacarosa, sin el parafilm.
9. 4 mg/l ABA, 30 g/L Sacarosa, con el parafilm.
10. 4 mg/l ABA, 30 g/L Sacarosa, sin el parafilm.
11. 4 mg/l ABA, 20 g/L Sacarosa, con el parafilm.
12. 4 mg/l ABA, 20 g/L Sacarosa, sin el parafilm.

Las variables a medirse al momento del trasplante fueron el peso fresco inicial (PFI) y número de raíces inicial (NRI); y a la cosecha la supervivencia (S), el peso fresco final (PFF), número de brotes final (NBF) y número de raíces final (NRF) (Anexo 4).

Una vez finalizado el experimento se procedió de igual manera a tabular los datos y analizarlos en programa estadístico MSTAT-L.

3.4.2.1 Procedimiento utilizado para la transferencia de las vitroplantas de etapa II a etapa III en el laboratorio. Las vitroplantas utilizadas en la segunda parte de esta investigación fueron obtenidas de previa inoculación de etapa II a etapa III en el laboratorio. Para poder realizar esta inoculación se preparó primeramente un medio de cultivo etapa III como aparece en el anexo 1 y que es una modificación del medio básico de Murashige y Skoog. Este medio fue originalmente desarrollado para cultivos de tejidos de tabaco pero han sido utilizado en muchas otras especies con muy buenos resultados. Se utiliza en la iniciación de cultivos de helechos, en la preparación de las plantas obtenidas *in vitro* para su trasplante.

Se preparó medio líquido y se utilizaron 360 tubos de ensayo de 15 x 150 mm. que fueron previamente identificados según el tratamiento y preparados con puentes de papel filtro. El medio de crecimiento se preparó con diferentes dosis de ácido abscísico (0 mg/l, 2 mg/l y 4 mg/l) y Sacarosa (20 g/l y 30 g/l) dependiendo del tratamiento.

Después de ajustar el pH a 5.8, se procedió a dispensar el medio de cultivo para enraizamiento en los contenedores, a razón de 10 ml por contenedor, y seguidamente se esterilizó el medio en el autoclave durante 20 minutos a 121°C y 15 psi de presión. Una vez enfriado el medio se procedió a la transferencia de las vitroplantas en una cámara de flujo laminar. Este trasplante se realizó el 20 de julio de 1999.

Después de once semanas se procedió al movimiento de las vitroplantas a etapa IV y la siembra en bandejas (8 de octubre de 1999). Previo a la siembra, cinco días antes, se retiró el parafilm de los tratamientos a los que se les debía remover el parafilm antes de la transferencia. Como ya se mencionó anteriormente, las plantas dentro del tubo de ensayo se encuentran bajo condiciones de esterilidad y de alta humedad relativa. Esta humedad relativa se puede ir gradualmente reduciendo al remover el parafilm unos cinco días antes del trasplante al suelo. La remoción de la cinta de parafilm dará potencialmente a la planta mayor tolerancia a la baja humedad relativa del medio ambiente y le facilitará su posterior adaptación a condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, traslocación y transpiración de agua.

A diferencia de la siembra pasada (Parte I) que se realizó bajo un sistema de nebulización, en esta segunda parte del experimento se modificó las condiciones de siembra realizándola al aire libre pero asperjando constantemente las plantas para evitar la acelerada deshidratación. Una vez sembradas las bandejas, éstas se introdujeron en los microinvernaderos. Este sistema de microinvernaderos es el sistema tradicional que se utiliza actualmente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación del Departamento de Agronomía.

3.4.2.2 Esterilización del sustrato utilizado en el invernadero. En cuanto a la esterilización del sustrato se procedió de igual manera que en la parte I. Se empacó el mismo en paquetes de papel manila. Luego estos paquetes se introdujeron en un autoclave a una temperatura de 120 °C durante 15 minutos con el fin de esterilizar los medios para evitar cualquier pérdida por bacterias.

3.4.2.3 Construcción de microinvernaderos. Para la construcción de los microinvernaderos se cortaron tablas de madera de 56 cm por 30 cm. A estas tablas se les hicieron tres perforaciones en cada extremo a lo largo de la tabla con taladro, procurando no atravesar toda la tabla, con el fin de colocar arcos de alambre número 8.

Después de haber introducido las bandejas ya sembradas con los diferentes tratamientos, se prosiguió a cubrir el microinvernadero con una bolsa plástica y se selló amarrando la misma al frente con un alambre de cobre emplastificado. Una vez sellados, los microinvernaderos se trasladaron a un invernadero cubierto con sarán que retiene el 60% de la luz que entra.

Una vez trasladados y sellados los microinvernaderos, se procedió a regar una vez por semana con el fin de evitar la pérdida de la humedad relativa. Esto se realizaba con una botella aspersora que emitía el agua en forma de nebulización. Los microinvernaderos se abrían lo menos posible con el fin de que no escapara la humedad de los mismos y nuevamente se volvía a sellar los microinvernaderos después del riego.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 PARTE I

En esta primera fase se evaluó el efecto de cinco sustratos. Los resultados se detallan a continuación.

4.1.1 Número de estolones

Como podemos apreciar en el cuadro 2, el mejor sustrato resultó ser el compost ya que produjo la mayor cantidad de estolones promedio por planta (4.0). Aunque no tuvo diferencia significativa estadísticamente con el sustrato de compost más arena, el compost tiene la característica de inducir mayor cantidad de estolones. Estos resultados sugieren que el helecho necesita de un alto contenido de nutrientes para desarrollar mayor cantidad de estolones, ya que comparando con los sustratos que utilizaron arena, corteza y fibra, estos no tienen una disponibilidad de nutrientes adecuada, se observó menor cantidad de estolones en estos últimos.

Los tratamientos de compost con arena, corteza con arena y corteza solamente, no tuvieron diferencias significativas y el resultado fue un número menor de estolones promedio por planta que al usar solamente compost. El tratamiento en el que se obtuvo menor número de estolones fue en el que se utilizó fibra como sustrato (1.2), ya que la fibra lo único que puede mejorar es la propiedad física del medio, pero no las propiedades químicas, por lo tanto no contribuyó a mejorar las condiciones para las vitroplantas. La misma situación se observó con el uso de corteza y corteza más arena, mismos que no tuvieron diferencias significativas comparados con la fibra.

Se observó así mismo, que las vitroplantas puestas en compost como sustrato, no solo tenían mayor número de estolones si no que también eran de tamaño superior a las transplantadas en los demás sustratos. Esto concuerda con los resultados del análisis estadístico y con la necesidad de nutrientes por parte de las vitroplantas transplantadas.

4.1.2 Número de brotes

El número de brotes fue muy similar y estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los cinco tratamientos (Cuadro 2). Estos resultados sugieren que, independientemente que usemos cualquiera de los cinco sustratos, el número de brotes va a ser igual.

4.1.3 Número de raíces

En el cuadro 2. Se puede apreciar que numérica y visualmente el mejor sustrato fue la fibra (5.0 raíces promedio por planta), seguido de la combinación de corteza con arena (4.9 raíces promedio por planta). La formación y desarrollo de raíces fue superior en estos medios debido a que cuentan con mejores características físicas, como ser: porosidad, aireación y soltura.

Aunque los resultados en el análisis estadístico nos indican que no hubo diferencias significativas entre los cinco tratamientos, esto se pudo deber al hecho de que poder llevar a cabo el conteo de raíces y estandarizar la forma de hacer el conteo fue bastante complicado. Algunas plantas presentaban raíces muy entrelazadas y enredadas; así mismo, diferenciar entre raíces principales y secundarias en varias plantas fue algo confuso, y por consiguiente se obtuvo una alta variabilidad entre datos.

Cuadro 2. Número de estolones, brotes y raíces emitidos luego de probar cinco tipos de sustratos en la aclimatación de *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis*, El Zamorano, Honduras 1999.

Tratamientos	Número de Estolones	Número de Brotes	Número de Raíces
Compost	4.0 a	2.0 a	3.6 a *
Compost + Arena	2.9 ab	2.2 a	3.7 a
Corteza + Arena	2.5 bc	1.9 a	4.9 a
Corteza	2.4 bc	2.1 a	3.0 a
Fibra	1.2 c	1.6 a	5.0 a

Los valores seguidos con la misma letra no difieren significativamente según la prueba Duncan ($P < 0.05$).

4.2 PARTE II

En esta segunda parte del experimento se evaluaron tres dosis de la hormona ácido abscísico (ABA) como pre-endurecedor en la aclimatación de los helechos, el uso de dos dosis de sacarosa y la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante al invernadero, con sus respectivas interacciones.

4.2.1 Ganancia de peso

Los resultados se pueden apreciar en el cuadro 3 donde se analizaron los efectos principales con sus respectivas interacciones. Para la ganancia promedio de peso por planta, se encontró diferencia significativa en la utilización de ABA en el medio para el endurecimiento de las vitroplantas.

Independiente de los otros factores analizados, el tratamiento con ABA que mejor resultado dió fue la dosis de 2 mg/l en el que se cuantificó una ganancia de peso promedio de 0.74 ± 0.06 g/planta (cuadro 6, anexo 5).

Con respecto al uso de la sacarosa, independiente de los otros factores, se observó una mayor ganancia de peso cuando se utilizó 30 g/l (0.65 ± 0.05 g/planta) que cuando se utilizó 20 g/l (0.58 ± 0.05 g/planta) aunque esta diferencia no fue significativa (cuadro 3). Esta tendencia en la respuesta de las plantas a los diferentes niveles de sacarosa se puede observar en el cuadro 6 y el anexo 5.

Con respecto a la remoción y no remoción de parafilm, independiente de los otros factores, se observó un leve incremento no significativo en la ganancia de peso cuando se removió el parafilm (0.64 ± 0.05 g/planta) (cuadro 6, anexo 5) que cuando no se removió el mismo (0.59 ± 0.05 g/planta) (cuadro 6, anexo 5) cinco días antes del trasplante.

Las diferentes interacciones no fueron estadísticamente significativas como se puede observar en el cuadro 3. Aunque en las gráficas del anexo 3 se puede observar la tendencia hacia la ganancia de peso usando 2 mg/l de ABA conjuntamente con 30 g/l de sacarosa, usando 2 mg/l de ABA con remoción de parafilm, y usando 30 g/l de sacarosa con remoción de parafilm.

Esto concuerda con lo encontrado por Colón en un estudio sobre los efectos del ABA, en la especie *Arbonia arbustifolia*, donde menciona que una suplementación media con ABA en la fase III de micropropagación puede servir como un tratamiento *in vitro* de pre-endurecimiento.

Cuadro 3. Análisis de varianza sobre la ganancia de peso promedio por planta en la aclimatación de *Nephtrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Prueba F	Prob.
Bloque	4	2.90405	0.72601	11.07	0.000
ABA	2	1.11195	0.55598	3.48	0.001*
Sacarosa	1	0.07322	0.07322	1.12	0.296
Parafilm	1	0.02791	0.02791	0.43	0.518
ABA x Sacarosa	2	0.18081	0.09040	1.38	0.263
ABA x parafilm	2	0.01353	0.00676	0.10	0.902
Sacarosa x parafilm	1	0.00211	0.00211	0.03	0.858
ABA x Sacarosa x Parafilm	2	0.35109	0.17555	2.68	0.080
Error	44	2.88573	0.06558		
Total	59	7.55040			

*Valor significativo con un $\alpha < 0.05$

4.2.2 Número de brotes

Aunque el cuadro 4. muestra que no hubo diferencias significativas entre usar ABA, sacarosa y remover vs. no remover el parafilm antes del trasplante, para el número de brotes se puede observar que hay una disminución en el número de brotes (1.5 ± 0.42 /

planta) (cuadro 6, anexo 6) cuando utilizamos 2 mg/l de ABA, y al contrario, hubo un aumento en el número de brotes al utilizar 30 g/l de sacarosa (2.13 ± 0.34 / planta) y cuando se removió el parafilm (2.31 ± 0.34 / planta) (cuadro 6, anexo 6).

La disminución en el número de brotes por el uso de ABA se pudo deber a que es una hormona que reduce la tasa de crecimiento ya que es una fitohormona del estrés (Colón et al, 1996). Así mismo el aumento en número de brotes debido al uso de 30 g/l de sacarosa se pudo deber a que la planta obtuvo mayor reservas de carbohidratos que le sirvieron para formar más brotes.

Cuadro 4. Análisis de varianza sobre número de brotes promedio por planta en la aclimatación de *Nephrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Prueba F	Prob.
Bloque	4	4.075	1.019	0.29	0.883
ABA	2	9.200	4.600	1.31	0.281
Sacarosa	1	0.425	0.425	0.12	0.730
Parafilm	1	4.347	4.347	1.24	0.272
ABA x Sacarosa	2	14.179	7.090	2.02	0.145
ABA x parafilm	2	2.543	1.272	0.36	0.699
Sacarosa x parafilm	1	0.005	0.005	0.00	0.970
ABA x Sacarosa x Parafilm	2	1.885	0.943	0.27	0.766
Error	44	154.715	3.516		
Total	59	7.55040			

Valor significativo con un $\alpha < 0.05$

4.2.3 Número de raíces

Los resultados se pueden apreciar en el cuadro 5 donde de igual manera se estudió la influencia de los varios factores principales (ABA, sacarosa, remoción vs. no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante) y sus interacciones en la variable número de raíces promedio por planta. Nuevamente se observó que el efecto principal responsable estadísticamente significativo fue el ABA a una dosis de 2 mg/l que resultó en un incremento significativo de 4.82 ± 0.39 raíces promedio por planta (cuadro 6, anexo 7) comparado a las dosis de 0 mg/l y 4 mg/l en los que se observó un número de raíces promedio de 3.56 ± 0.39 y 3.30 ± 0.39 respectivamente (cuadro 6).

Aún cuando no se obtuvo diferencia significativa, existe una leve tendencia por parte de la sacarosa, independientemente de los otros factores estudiados, de aumentar el número de raíces promedio por planta cuando se utiliza una dosis de 30 g/l (3.98 ± 0.32) (cuadro 6, anexo 7).

Por el contrario se observa que para el parafilm, aunque no hubo diferencia estadística, hay una tendencia de reducir el número de raíces cuando el parafilm fue removido antes

de el trasplante (cuadro 6, anexo 7). Hurtado y Merino (1987) mencionan que al retirar el parafilm 5 días antes del trasplante la vitroplanta comienza su proceso de aclimatación pero no discute acerca del proceso de formación de raíces durante este período de aclimatación.

En lo referente a las interacciones no se ha encontrado diferencia significativa aunque para ambas interacciones ABA-parafilm y ABA-sacarosa, la dosis de 2 mg/l muestra una tendencia de incrementar el número de raíces promedio por planta (anexo 10).

Cuadro 5. Análisis de varianza sobre el número de raíces promedio por planta en la aclimatación de *Nephtrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Prueba F	Prob.
Bloque	4	186.415	46.604	15.30	0.000
ABA	2	26.351	13.176	4.33	0.019*
Sacarosa	1	0.506	0.506	0.17	0.686
Parafilm	1	1.264	1.264	0.42	0.523
ABA x Sacarosa	2	1.636	0.818	0.27	0.776
ABA x parafilm	2	10.431	5.216	1.71	0.792
Sacarosa x parafilm	1	0.843	0.843	0.28	0.602
ABA x Sacarosa x Parafilm	2	21.518	10.790	3.54	0.037
Error	44	134.013	3.046		
Total	59	383.040			

*Valor significativo con un $\alpha < 0,05$

Cuadro 6. Valores promedio y desviaciones estándar para ganancia de peso, número de brotes y número de raíces promedio por planta en la aclimatación de *Nephtrolepis cordigera* como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999.

	Ganancia de Peso (g)		Número de Brotes		Número de Raíces	
	Media	Desv. Std	Media	Desv. Std	Media	Desv. Std
ABA						
0	0.42	0.06	2.41	0.42	3.56	0.39
2	0.74	0.06	1.50	0.42	4.82	0.39
4	0.68	0.06	2.21	0.42	3.30	0.39
Sacarosa						
20	0.58	0.05	1.95	0.34	3.80	0.32
30	0.65	0.05	2.13	0.34	3.98	0.32
Parafilm						
No remoción	0.59	0.05	1.77	0.34	4.04	0.32
Remoción	0.64	0.05	2.31	0.34	3.74	0.32

5. CONCLUSIONES

1. Para la aclimatación del helecho *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis*, bajo un sistema de riego por nebulización, el mejor sustrato que se recomienda es el compost debido a su alto contenido de nutrientes.
2. Para aclimatar las plantas es preferible utilizar los microinvernaderos, ya que podemos controlar la humedad y es más económico. Con el sistema de nebulización, si no se maneja adecuadamente se corre el riesgo de perder las plantas por hongos y por pudrición de raíces, además de que es altamente costoso por su infraestructura.
3. Para obtener una mayor ganancia de peso y un mayor número de brotes en las vitroplantas ya aclimatadas de *Nephrolepis cordigera*, se debe usar una dosis de 2 mg/l de ABA. Con esta dosis hay cambios anatómicos y fisiológicos en la vitroplanta que aumentan la supervivencia de las plantas en el proceso de aclimatación.
4. En el proceso de endurecimiento de vitroplantas de *Nephrolepis cordigera*, incrementar las dosis de sacarosa de 20 a 30 g/l en el medio de cultivo crapa III no tiene ningún efecto significativo en la ganancia de peso, ni en el número de brotes y raíces promedio obtenidos por planta.
5. En el proceso de endurecimiento de vitroplantas de *Nephrolepis cordigera*, la remoción de parafilm cinco días antes del trasplante al invernadero, no tiene ningún efecto significativo en la ganancia de peso, ni en el número de brotes y raíces promedio obtenidos por planta.

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar nuevamente ensayos con la eliminación del parafilm en los tubos de ensayo, para verificar si realmente hay algún efecto significativo de esta práctica en el endurecimiento de las vitroplantas antes de su trasplante al invernadero. Para comprobar su funcionalidad se sugiere trabajar con diferentes especies.
2. Continuar investigando sobre la influencia de diferentes tipos de sustratos y mezclas en la aclimatación de los helechos bajo diferentes sistemas.
3. Realizar una investigación usando el microinvernadero y una estructura abierta con diferentes dosis de ABA para determinar la supervivencia de las vitroplantas.
4. Continuar con el estudio llevando las plantas a un estado de desarrollo comercial y comparar los costos de producción.
5. Probar la aclimatación de helechos en un sistema de túnel, pintando el plástico con pintura blanca para evitar la penetración de rayos solares y controlar más los factores ambientales como la humedad relativa especialmente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- COLON, W.; NELL, T.A.; KANE, M.E.; BARRETT, J.E. 1996. Effects of Abscisic Acid on Ex Vitro Acclimatization of *Aronia arbutifolia* (L) Pers. J.Amer. Soc. Hort Sci. 121(1):101-104. Estados Unidos.
- COLON, W.; RODRIGUEZ, J.C.; 1996. Fisiología Vegetal Tercera Ed. Publicación Departamento de Agronomía AG-9608. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 104 p.
- ESPINAL, D.; ALÁN, J., 1997. Propagación *in Vitro* de Helecho Cola de Quetzal (*Nephrolepis cordigera*). Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano) Honduras.
- GERRIT, D.; KNAPP, S.; MARIO, S.; 1995. Flora Mesoamericana Vol 1. Universidad Autónoma de México México. 300 p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. 1997. Propagación de Plantas. Trad. por: Compañía Editorial Continental, S.A. DEC.V. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A. DEC.V. México. 760 p.
- HURTADO M.,D.V; MERINO M.,ME 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Tercera Ed. Editorial Trillas. México. 232 p.
- INSTITUTO NACIONAL DE APRENDIZAJE.; 1994. Propagación Clonal *in vitro* de diferentes especies vegetales en el laboratorio del INA. San José, Costa Rica.
- KYTE L.; 1996. Plants From Test Tubes. Segunda Ed. Timber Press. Portland, Oregon. Estados Unidos. 160 p.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- MURILLO, M.T.; 1983. Usos de los Helechos. Segunda edición, Compañía Editorial Presencia. Ltda. Bogotá Colombia. 156 p.
- USUL, K.; OKABE, K.; VICTORES, P.R.; RAMIREZ, A.E. 1996. Principios Básicos de Cultivos de Tejidos Vegetales. ICTA, JOCV. Guatemala. 166 p.
- VILLEE, A.C.; 1996. Biología McGraw-Hill Interamericana. Editores, S.A. de C.V. Octava Ed. México

8. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo y medios de crecimiento utilizados en las diferentes etapas de micropropagación para *Nephrolepis cordigera* (helecho Cola de Quetzal) y *Nephrolepis exaltata* cv. *Bostoniensis* (helecho Bostoniensis) en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, El Zamorano, Honduras.

Preparación y desinfección de explantes

Para la siembra en etapa I se utilizan secciones de estolón en crecimiento activo provenientes de plantas sanas. En la preparación de los estolones se siguen los siguientes pasos:

1. Inmediatamente después de su cosecha, los estolones se deben lavar cuidadosamente en el laboratorio con abundante agua y jabón líquido para remover rastros de polvo.
2. Seguidamente los estolones se seccionan en segmentos de aproximadamente 2 cm y se colocan en enjuague directamente bajo el chorro de agua de la llave durante 15 minutos
3. Luego de este enjuague se recortan ambos extremos de cada segmento dejando segmentos de aproximadamente 1.5 cm.
4. Los segmentos se llevan a un enjuague en solución antioxidante durante 15 minutos. La solución antioxidante se preparara con 100 mg/l de ácido ascórbico y 150 mg/l de ácido cítrico.
5. Para desinfección superficial de los explantes se utiliza una solución desinfectante a base de NaOCl al 20% v/v (Chlorox al 5.25% i.a.) durante 15 minutos con agitación frecuente, más tres gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución.
6. A nivel de la cámara de flujo laminar se procede a hacer dos enjuagues de 5 minutos cada uno con agua destilada estéril.
7. Finalmente se recortan los extremos que estuvieron en contacto con el cloro y se procede a la siembra.

Etapa I (Establecimiento)

Nota: utilizar medio sólido o líquido.

Componentes	1 Litro
Macroelementos	100 ml (solución madre 10x)
Microelementos	1 ml (solución madre 1000x)
Hierro	5 ml (solución madre 200x)
Inositol	100 mg
Tiamina	0,4 mg
Kinetina	1,0 mg
ANA	0,1 mg
Phytigel	3,75 g
Sacarosa	30 g
pH= 5,7	

Fuente: Protocolo desarrollado en Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, El Zamorano, Honduras.

Etapa II (Multiplicación)

Nota: utilizar medio sólido o líquido.

Componentes	1 Litro
Macroelementos	100 ml (solución madre 10x)
Microelementos	1 ml (solución madre 1000x)
Hierro	5 ml (solución madre 200x)
Inositol	100 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	225 mg
Kinetina	2,0 mg
ANA	0,1 mg
Tiamina	0,4 mg
Phytigel	3,75 g
Sacarosa	30 g
pH= 5,7	

Fuente: Joiner, J.N. 1981. Foliage Plant Production.

Etapa III (Enraizamiento)

Nota: utilizar medio sólido o líquido.

Componentes	1 Litro
Macroelementos	100 ml (solución madre 10x)
Microelementos	1 ml (solución madre 1000x)
Hierro	1 ml (solución madre 200x)
Inositol	100 mg
Acido Nicotínico	0,5 mg
Piridoxina	0,5 mg
Tiamina	0,4 mg
ANA	0,1 mg
Sacarosa	20 g
Phytigel	3,75
pH= 5,7	

Fuente: Instituto Nacional de Aprendizaje. 1994. Propagación Clonal *in vitro* de diferentes especies vegetales en el laboratorio del INA. San José, Costa Rica

Anexo 2. Formulación Básica de sales minerales y complementos orgánicos de Murashige y Skoog (MS)

Componentes	1 Litro
Macroelementos	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microelementos	mg/l
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
KI	0.83
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
Hierro	mg/l
FeNa ₂ EDTA	10

Componentes	1 Litro
Vitaminas	mg/l
Inositol	100
Acido Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.4

Fuente: Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Anexo 3. Soluciones madre de sales minerales de Murashige y Skoog (MS) utilizadas en la preparación de los medios de crecimiento para las diferentes etapas en la micropropagación de los helechos *Nephrolepis. exaltata* cv. *Bostoniensis* y *N. cordigera*.

Solución Madre de Macronutrientes (10x)

Utilizar 100 ml por litro de medio de crecimiento

Componentes	1 Litro
Macroelementos	mg/l
KNO ₃	19.00
NH ₄ NO ₃	16.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	4.40
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.70
KH ₂ PO ₄	1.70

Fuente: Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, El Zamorano Honduras

Solución Madre de Micronutrientes (1000x)

Utilizar 1 ml por litro de medio de crecimiento

Micronutrientes	mg/l
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
KI	0.83
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025

Fuente: Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, El Zamorano Honduras

Solución Madre de Hierro (200x)

Utilizar 5 ml por litro de medio de crecimiento

Hierro	mg/l
FeNa ₂ EDTA	10

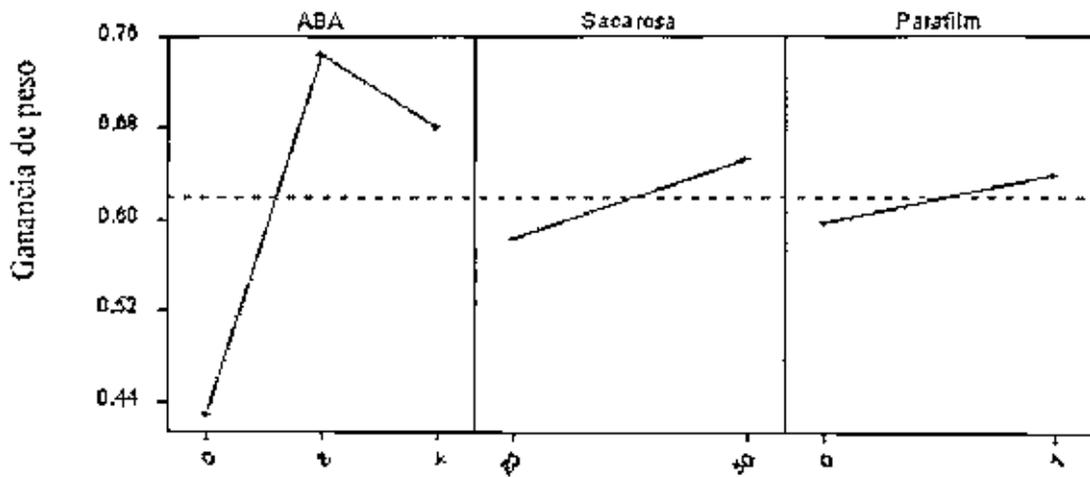
Fuente: Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación, El Zamorano Honduras

Anexo 4. Datos recolectados en la transferencia de etapa III a etapa IV de vitroplantas de *Nephrolepis cordigera* (helecho cola de quetzal) como respuesta a la remoción y no remoción de parafilm cinco días antes del trasplante, y a distintas dosis de ABA y sacarosa en la etapa III de pre-trasplante, El Zamorano, Honduras 1999.

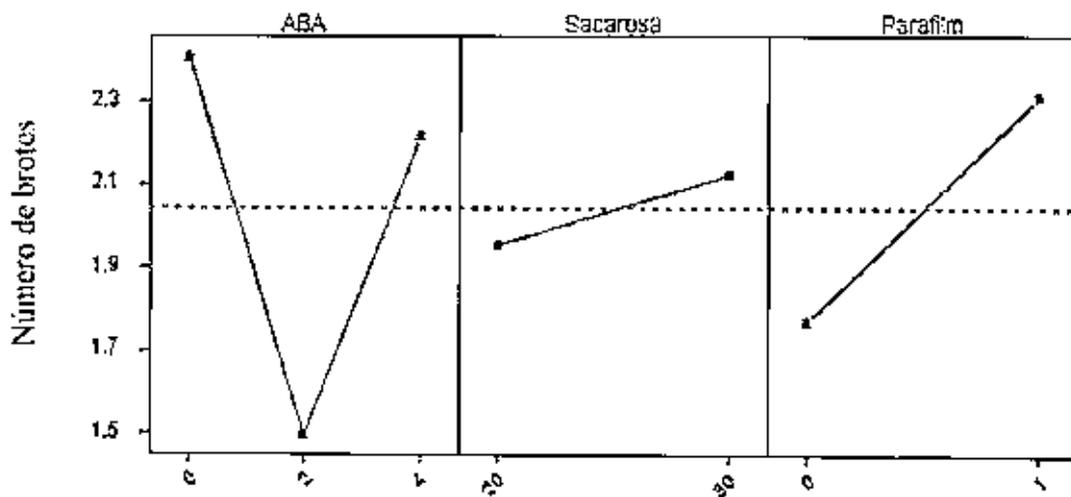
Repet.	ABA	Sacarosa	Parafilm	Ganancia de Peso (g/planta)	Número promedio de brotes /planta	Número promedio de raíces /planta
1	0	30	1	1.10	2.8	3.2
1	0	30	0	0.27	3.0	2.6
1	0	20	1	0.64	0.0	4.0
1	0	20	0	0.33	0.8	3.8
1	2	30	1	1.36	0.4	4.8
1	2	30	0	1.02	0.0	4.6
1	2	20	1	0.89	0.0	2.6
1	2	20	0	1.24	2.8	6.0
1	4	30	1	0.67	9.4	0.8
1	4	30	0	1.17	3.6	5.8
1	4	20	1	1.50	6.7	4.2
1	4	20	0	0.90	0.0	2.8
2	0	30	1	0.49	2.2	3.6
2	0	30	0	0.85	4.2	8.8
2	0	20	1	0.23	1.6	3.8
2	0	20	0	0.42	2.0	10.6
2	2	30	1	1.66	3.8	14.4
2	2	30	0	1.21	0.0	6.0
2	2	20	1	0.91	4.6	12.0
2	2	20	0	0.94	0.2	6.4
2	4	30	1	0.55	1.4	6.8
2	4	30	0	0.56	0.6	5.2
2	4	20	1	0.59	1.0	4.6
2	4	20	0	0.69	3.6	3.8
3	0	30	1	0.00	4.2	3.6
3	0	30	0	0.37	2.2	4.2
3	0	20	1	0.24	3.2	4.4
3	0	20	0	0.21	2.2	3.2
3	2	30	1	0.25	0.4	4.6
3	2	30	0	0.19	0.0	2.8
3	2	20	1	0.20	0.8	2.4
3	2	20	0	0.43	1.4	5.0
3	4	30	1	0.86	1.8	3.0
3	4	30	0	0.43	0.6	5.0
3	4	20	1	0.77	1.6	3.6
3	4	20	0	0.35	1.4	3.0

Repet.	ABA	Sacarosa	Parafilm	Ganancia de Peso (g/planta)	Número promedio de brotes /planta	Número promedio de raíces /planta
4	0	30	1	0.52	3.0	1.6
4	0	30	0	0.10	0.6	1.6
4	0	20	1	0.17	3.0	1.0
4	0	20	0	0.29	2.8	1.6
4	2	30	1	0.76	0.4	3.0
4	2	30	0	0.25	0.4	3.4
4	2	20	1	0.48	2.6	1.2
4	2	20	0	0.23	2.2	3.2
4	4	30	1	0.10	1.0	1.0
4	4	30	0	0.75	2.4	2.6
4	4	20	1	0.52	4.0	1.6
4	4	20	0	0.34	1.2	2.2
5	0	30	1	0.51	2.6	1.6
5	0	30	0	0.78	5.0	3.6
5	0	20	1	0.40	2.4	2.0
5	0	20	0	0.52	0.4	2.4
5	2	30	1	0.70	1.6	5.0
5	2	30	0	0.73	2.2	2.4
5	2	20	1	0.60	2.0	1.6
5	2	20	0	0.74	4.2	5.0
5	4	30	1	0.61	0.8	2.4
5	4	30	0	0.65	3.2	1.6
5	4	20	1	0.78	0.0	4.0
5	4	20	0	0.75	0.0	2.0

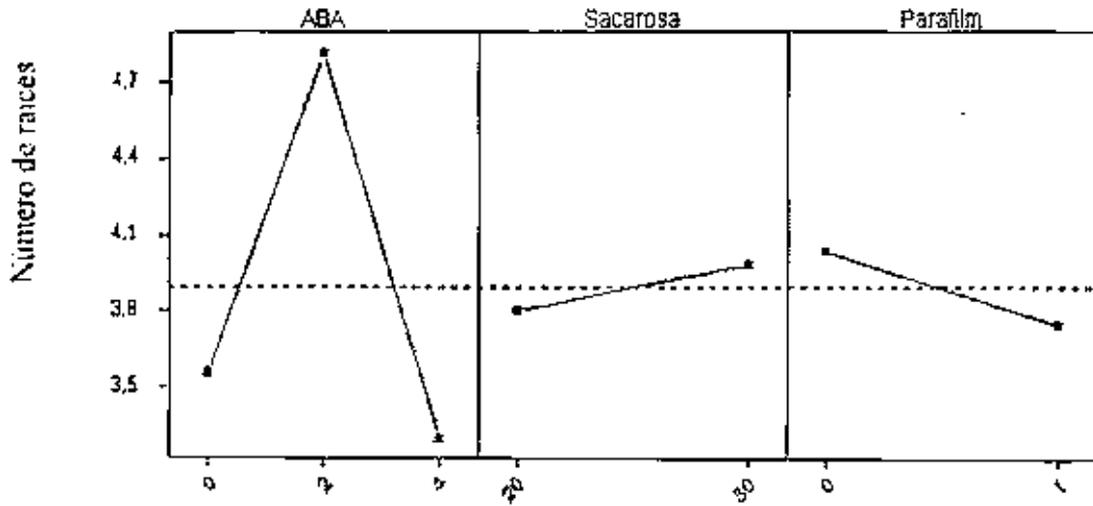
Anexo 5. Efecto de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre la ganancia de peso promedio (g) por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordígera*, El Zamorano, Honduras 1999.



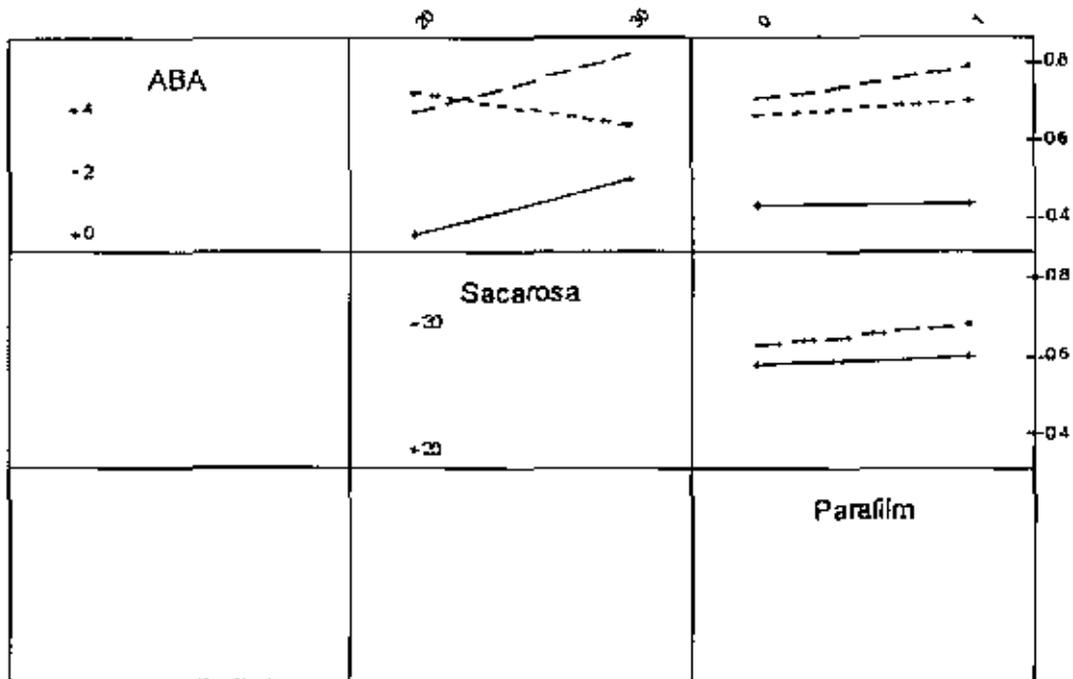
Anexo 6. Efecto de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de brotes promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999.



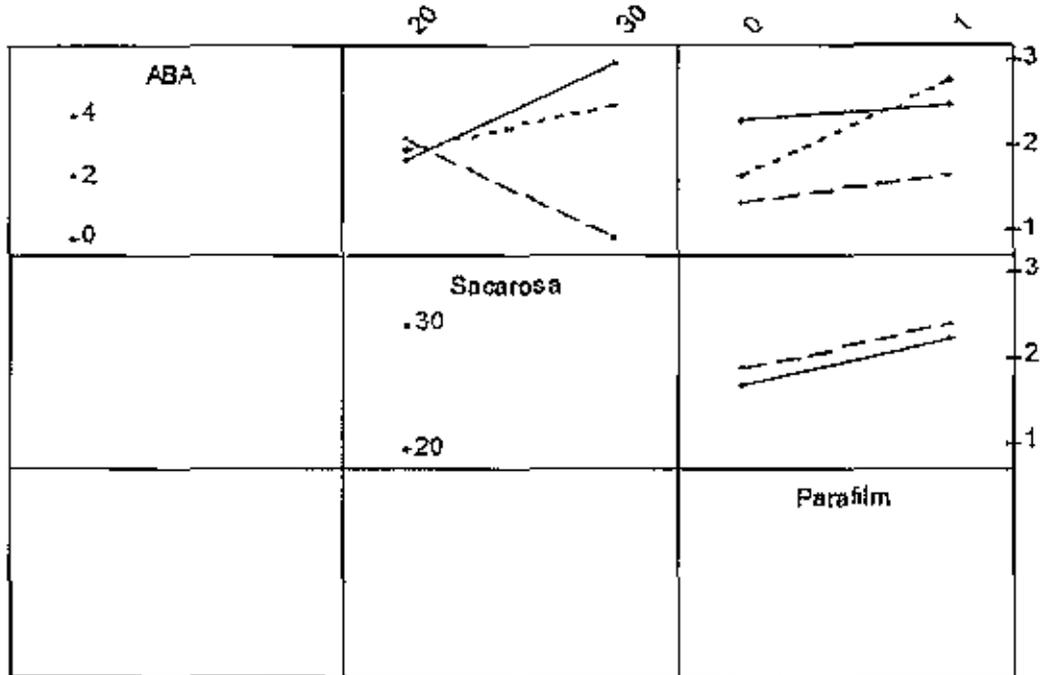
Anexo 7. Efecto de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de raíces promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephtrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999.



Anexo 8. Efecto de las interacciones de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre la ganancia de peso promedio (g) por planta en el proceso de aclimatación de *Nephtrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999.



Anexo 9. Efecto de las interacciones de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de brotes promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordifera*, El Zamorano, Honduras 1999.



Anexo 10. Efecto de las interacciones de los tres factores principales: dosis de ABA (mg/l) y sacarosa (g/l) en etapa III, y remoción (1) vs. no remoción (0) de parafilm cinco días antes del trasplante, sobre el número de raíces promedio por planta en el proceso de aclimatación de *Nephrolepis cordigera*, El Zamorano, Honduras 1999.

