

Crecimiento *in vitro* de musgos del bosque nublado andino de Venezuela

In vitro growth of some moss species from the Venezuelan cloud andean forest

Melangel Tacoronte B.*; Yelitza León V.**; Auxiliadora Olivo* y María Vielma A.*

Recibido: 06-01-09 / Aceptado: 18-09-09

Resumen

En Los Andes venezolanos, cada año los musgos eran extraídos de forma indiscriminada y comercializados. Se han implementado algunas medidas conservacionistas; sin embargo, es necesario proponer estrategias alternativas de conservación y manejo, las cuales requieren que se conozca la biología de las especies. En este sentido, se estudió el crecimiento en condiciones *in vitro* de ocho especies de musgos comunes de los bosques nublados que rodean la ciudad de Mérida, Venezuela. Dos tipos de explantes fueron aislados y cultivados *in vitro*: a) esporas extraídas de cápsulas esterilizadas con alcohol al 70 % un minuto, luego en hipoclorito al 1% más una gota de tween durante cinco minutos, b) segmentos de gametofitos esterilizados con hipoclorito al 0,1% un minuto, logrando retardar la contaminación. Se alcanzó la germinación, formación del protonema y el desarrollo completo del gametofito. Se observó respuesta de propagación en seis especies de musgo durante 10 meses y el promedio de crecimiento en vástagos fue 5,22 mm, el mayor se registró en *Orthostichella muelleri* con 13,2 mm, llegando finalmente a desarrollar rizoides. El crecimiento observado en el laboratorio es lento, de lo que se infiere que en condiciones naturales, la extracción amenaza la recuperación de los musgos.

Palabras clave: briofitos, musgos, micropropagación, propagación sexual, germinación, desarrollo, conservación.

* Ingeniero Forestal ULA, MSc. en Manejo de Bosques ULA, Investigadora Facultad de Ciencias ULA. Laboratorio de Cultivos in Vitro Departamento de Biología tacoront@ula.ve

** Centro Jardín Botánico Facultad de Ciencias. Facultad de Ciencias Universidad de Los Andes, Nucleo Universitario Pedro Rincón Gutiérrez (La Hechicera) Edificio A. Apartado postal 52. Zona postal 5101. Mérida, Edo. Mérida.

Abstract

In the Venezuelan Andes, mosses are massively extracted on an annual basis for commercial purposes. Although certain conservation measures have been taken, it is necessary to propose alternative conservation and management strategies, for which it is essential to have an adequate knowledge on the species biology. Therefore, we investigated *in vitro* germination and development patterns of eight moss species from an Andean cloud forest located in Mérida, Venezuela. Two types of explants were isolated and cultured in the lab: a) spores extracted from capsules sterilized with 70 % alcohol during one minute, followed by 1% hypochlorite solution with a drop of tween during five minutes. b) Gametophytes segments were sterilized by immersion in 0.1% hypochlorite solution during one minute delaying contamination. Spores germination was followed by protonema and full gametophyte development. Mean growth rate of gametophytes segments after 10 months of cultivation was 5.22 mm, *Orthostichella muelleri* presented the highest growth rate of all of the species studied, growing 13.2 mm. The slow growth rates observed in the laboratory during this study suggest that in natural conditions, massive extraction most likely threatens mosses recovery.

Key words: bryophytes, mosses, micropropagation, sexual propagation, germination, development, conservation.

Introducción

La selva nublada es un ambiente óptimo para el establecimiento de los briófitos, dada su alta humedad relativa y temperatura ideal. Allí se registra la máxima biomasa y diversidad de este grupo en el neotrópico (Frahm, 1990; León, 2001). Los briófitos (musgos hepáticas y antocerotes) tienen gran importancia en estos ecosistemas por su participación activa en el equilibrio hídrico, ya que absorben grandes cantidades de agua y nutrientes por todo su cuerpo vegetativo. Al formar capas densas sobre el suelo, troncos del bosque, cumplen la función de ser grandes interceptores de lluvia que al caer es retenida, infiltrada y evaporada lentamente quedando los suelos protegidos. De esta manera, los briófitos contribuyen con otras plantas en el mantenimiento de la humedad del bosque, además absorben los contaminantes del aire y favorecen el desarrollo de muchas plantas vasculares y animales. Son sustratos adecuados para un gran número de cianobacterias, las cuales son fijadoras

de nitrógeno, elemento esencial para las plantas superiores (Gradstein *et al.*, 2001).

En general, se afirma que la recuperación de biomasa en regiones tropicales es lenta (Jacobsen, 1978). Muchas especies de musgos podrían desaparecer por causa de la extracción indiscriminada y la destrucción acelerada de las selvas nubladas andinas. Hoy en día, los ecosistemas de esta selva son considerados, como los más amenazados del planeta, según (Bruijnzeel y Hamilton, 2001). La aplicación de estrategias conservacionistas es indispensable a corto plazo, para esto, es importante tener un conocimiento integral de las especies que se desean proteger. Particularmente en Venezuela, el estado de conservación de los musgos es incierto, se estima que hay unas 1.012 especies de musgos y 1.250 especies de hepáticas y dos géneros de Antocerotes con un número menor, pero aún desconocido de especies (León y Rico, 2004). Por otra parte, el inventario de los musgos del país es incompleto, ya que hay regiones aún sin explorar.

En Venezuela, así como en muchos países del geotrópico, hay aprovechamiento de musgos en la época navideña cuando se expenden grandes cantidades a los mercados, para ser usados en nacimientos simulando el césped. Hoy en día, el público venezolano se ha concientizado acerca de la importancia de estos organismos a través de campañas conservacionistas que han implementado entes gubernamentales, la Universidad de Los Andes y ONGs, alertando las consecuencias que acarrea la práctica anual de extracción masiva de musgos. A partir del año 2003, en Venezuela se impulsó una campaña en pro de la conservación de los musgos (León y Ussher, 2005), la cual, entre otros resultados de importancia, conllevó a la promulgación gubernamental de la Resolución N° 122 del año 2005, posteriormente, la resolución N° 52, *Gaceta Oficial* N° 38.963 del año 2008 de la República Bolivariana de Venezuela, en la que expresamente se prohíbe por un lapso de tres años, la extracción, transporte, comercialización, aprovechamiento y cualquier otro tipo de intervención de briofitos (musgos, hepáticas y antoceros) y otras plantas de sus ecosistemas naturales.

Estas resoluciones conservacionistas, junto a la recolección de datos, actualización de información y las investigaciones de la biología básica de los musgos, permitirán indudablemente mayor efectividad en la conservación de los mismos y amortiguar los efectos de su extracción estableciendo una

plataforma de conocimiento de las especies e implementar también planes de manejo.

En los últimos años, se han generado datos acerca de la ecofisiología de los musgos, su morfología y el posible rol que juegan sus estructuras con relación a su posición en el gradiente vertical de la selva nublada (León, 2006; León *et al.*, 2006).

León (2001) indica que en la selva nublada de San Eusebio en el Estado Mérida, Venezuela, existen 96 especies de musgos epífitos. Según la autora, hay una correlación significativa entre la reproducción y el hábitat, así, los musgos terrestres y los epífitos del dosel se reproducen más sexualmente que los epífitos del sotobosque. Estos últimos en su mayoría son dioicos y se reproducen con más frecuencia asexualmente.

During y Van Tooren (1987) destacan que los briófitos al igual que las plantas vasculares tienen diferentes estrategias reproductivas. Entre éstas se cuentan: el tamaño de las esporas, recurrencia en reproducción asexual y duración del ciclo de vida. Las especies colonizadoras tienen ciclos de vida cortos y mayor inversión en reproducción sexual, mientras que las especies perennes se comportan de manera inversa. Dentro de las colonizadoras, hay especies de crecimiento lento y ciclos de vida más largos (pioneros) y otras por el contrario, de ciclos más rápidos. Entre las perennes, hay estrategias para competidores así como para especies que tienen crecimiento lento y que son tolerantes de estrés.

La producción de propágulos para la reproducción vegetativa es común en los briófitos, sobre todo en los perennes que han perdido la habilidad de reproducirse sexualmente. Algunos de estos propágulos se producen regularmente y constan de filamentos de varias células de largo que se producen en las axilas de los filidios. Otros, llamados cuerpos de Brood, se producen cuando el medio de cultivo se agota o cuando empeoran las condiciones ambientales. Entre estos propágulos se encuentran los braquicitos son células redondeadas con pared gruesa que pueden formar cadenas y son producidas por el protonema filamentoso (Deckert *et al.*, 2006).

En los briófitos, el ciclo de vida comienza con la germinación de la espora, ésta consiste en la ruptura de la pared de la espora y la emergencia de una célula apical que se divide y deja atrás una célula intercalar. En muchas especies de musgos, la célula apical se divide en un plano para formar

un filamento llamado protonema formado por células con paredes delgadas y numerosos cloroplastos pequeños. Este protonema se ramifica de forma diferente en cada taxón y es un carácter importante para géneros y especies. En algunas especies, el protonema consiste en un filamento constituido por células con abundantes cloroplastos o rizoides, ambos caracterizados por paredes inclinadas, este filamento se denomina caulonema (Allsop y Mitra, 1958).

El patrón de ramificación del protonema y el tiempo que tarda en producir el gametóforo es importante para el establecimiento de las plantas. La ruptura de la espora y emergencia de protonemas ocurre en otras especies de selva nublada en una o dos semanas, (León, 1999).

El tipo de propágulo utilizado por cada especie para la reproducción es determinante para el éxito en el establecimiento de los individuos que se reproducen con menos frecuencia de manera sexual y para estudiar el rol de los estadios juveniles en la biología reproductiva de las plantas. (Duckett *et al.*, 2004). De acuerdo a estos autores, los patrones de germinación de protonemas obtenidos por medio de cultivos *in vitro* son básicamente idénticos a los patrones encontrados en la naturaleza. Así, la técnica de cultivos *in vitro* es también una herramienta excelente para estudios sistemáticos, ya que no se presentan cambios morfológicos, ni tampoco propician variaciones somaclonales.

Hoy en día, son pocos estudios e investigaciones registradas de germinación y crecimiento de musgos neotropicales. (Odu, 1981) informa que la mayoría de estos estudios se han realizado en especies africanas o de zonas templada.

Para cubrir esta carencia de conocimiento acerca de los musgos, en este estudio de *cultivo in vitro*, se estandarizó el protocolo para ocho especies de musgos comunes de la selva nublada andina, metodología que finalmente permitió el seguimiento de respuestas de germinación, desarrollo, crecimiento y diferenciación de los tejidos, hasta obtener una microplántula.

Materiales y métodos

I Fase de campo

Las especies colectadas fueron: ***Neckera chilensis*** Schimp. Ex Mont. ***Hypopterygium tamariscinum*** (Hedf.) Brid. ***Calyptothecium duplicatum*** (Schwägr.) Broth, ***Pterobryum densum*** (Schwägr.) Hornsch, ***Squamidium nigricans*** (Hook.) Broth, ***Meteorium laevifolium*** Mitt., ***Prionodon densus*** (Hedw.) Müll. ***Orthostichella muelleri*** (Dusén) B.H. Allen & Magill. De estas especies sólo ***H. tamariscinum*** y ***N. chilensis*** son autoicas y se encontraron con esporofito por lo que se estudió la germinación. El resto de las especies en estudio: ***C. duplicatum***, ***Pterobryum densum*** (Schwägr.) Hornsch, ***Squamidium nigricans*** (Hook.) Broth, ***Meteorium laevifolium*** Mitt., ***Prionodon densus*** (Hedw.) Müll. ***Orthostichella muelleri*** (Dusén) B.H. Allen & Magill, fueron cultivadas a partir de fragmentos del gametofito y cultivo de propágulos para la reproducción asexual en ***C. duplicatum*** y ***Pterobryum densum***.

El trabajo de campo se realizó en el bosque nublado de Monte Zerpa municipio Libertador, estado Mérida, Venezuela (aproximadamente N 08° 37' 57" W 71° 09'44" a 2.300 msnm).

La selección de las especies estuvo fundamentada en la disponibilidad y vigorosidad del material vegetal, en su estadio, su madurez (esporofito o gametofito). Los especímenes voucher se depositaron en la colección de criptógamas del herbario MERC.

II Fase de Laboratorio

- a) Preparación del medio de cultivo estéril (Macroelementos de Parker y Microelementos de Thompson) descrito por Klekowski (1969). Este fue distribuido 15 ml por cajas de petri.
- b) Aislamiento, esterilización y cultivo de explantes (esporas y segmentos de gametofitos): Para extraer las esporas, se procedió a esterilizar cápsulas del esporofito maduras, se caracterizaban por presentar una coloración dorada a marrón claro. Las cápsulas se separaron de sus setas cuidadosamente con pinzas finas y con la ayuda de una lupa estereoscópica. Las mismas fueron colocadas en una caja de petri para su esteri-

lización, primero, en alcohol al 70% por 1 minuto, luego, en una solución de hipoclorito de sodio al 1% más una gota de tween por 5 segundos, seguido de lavados continuos con agua destilada estéril, de manera de eliminar los restos de hipoclorito. Para el cultivo de las esporas, con la ayuda de la lupa estereoscópica, cada cápsula estéril fue disectada, y se dispersaron las esporas suavemente sobre el medio de cultivo estéril. Los segmentos de gametofitos fueron aislados y con una longitud aproximada de 4 cm de largo. Para cumplir los pasos de esterilización y cultivo del explante, las plantas madres, antes de ser introducidas al laboratorio, fueron lavadas bajo chorro abierto eliminando, en lo posible, toda tierra adherida y cualquier microorganismo acompañante. Luego, fueron revisadas bajo lupa, seleccionando los tejidos más jóvenes y vigorosos, garantizando el explante de mayor respuesta a la propagación vegetativa. Diferentes tratamientos de esterilización de explantes fueron aplicados y seleccionado entre ellos el más efectivo y el menos erosivo para el tejido vegetal. Los tratamientos se establecieron, por un factorial de tiempo de inmersión y la concentración de la solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial 5.25%) e incluyendo el tratamiento control, es decir, tejido vegetal no tratado (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de esterilización para tejido vegetal.

concentración tiempo	0.5%	0.1%	0.01%
1 minuto	Tram1	Tram 2	Tram3
3 minutos	Tram4	Tram5	Tram6
5 minutos	Tram7	Tram8	Tram9

Para determinar la efectividad del tratamiento de esterilización del tejido vegetal, dos criterios fueron evaluados: 1) la reacción del tejido, si presentó o no marchitamiento ante las diferentes concentraciones y el tiempo de inmersión de hipoclorito de sodio. 2) Contaminación de los explantes.

Se sembraron 10 segmentos por caja de petri (Figura 1), en total se cultivaron 4 cajas por especie y por tratamiento, representando en total 40 explantes por tratamiento.

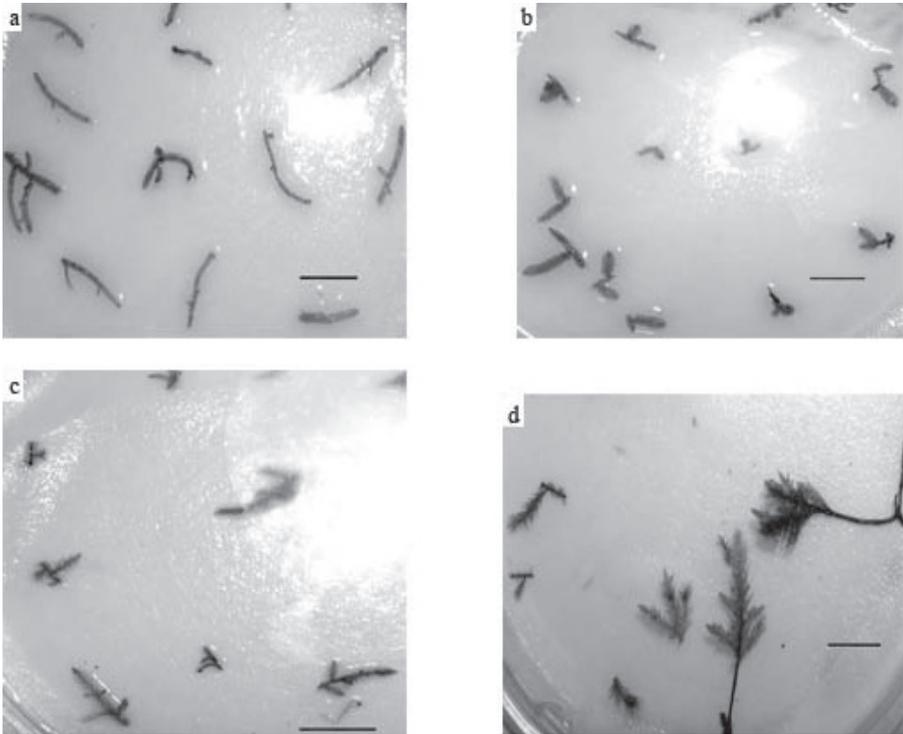


Figura 1. Segmentos cultivados de 2 cm bajo condiciones asépticas de: a. *Meteorium laevifolium*, b. *Squamidium nigricans*, c. *Orthostichella muelleri*, d. *Prionodon densus*.

Todos los pasos de esterilización y cultivo, tanto de cápsula como de tejido vegetal, se realizaron dentro de una cámara de flujo laminar.

- c) Condiciones ambientales de crecimiento de los cultivos: Los cultivos fueron expuestos a la luz natural, cerca de una ventana con orientación noroeste.
- d) Seguimiento de las respuestas de los cultivos: Las observaciones de las esporas se realizaron los primeros diez días, luego fueron distanciadas a una vez por semana. Se observaron los distintos estadios o etapas de desarrollo: rompimiento de la pared de la espora (germinación), inicio del protonema, aparición de yemas, desarrollo del gametóforo y aparición de rizoides. Para la documentación gráfica de las diferentes etapas, las

esporas y los protonemas fueron transferidos a portaobjetos, para ser observados en un microscopio Zeiss Axiolab y fotografiado con una cámara digital Olympus 7070.

En los cultivos de segmentos de gametofitos, se realizó un seguimiento de contaminación, coloración del tejido, posteriormente, la diferenciación o no de protonema secundario, crecimiento del caulidio a partir de las yemas caulinares. Se realizaron dos mediciones con un vernier bajo la lupa estereoscópica del caulidio secundario y del caulidio primario, luego de la segmentación y se determinó el crecimiento durante un año de observación.

Resultados

La esterilización de las cápsulas cerradas resultó exitosa, propiciando la germinación. Al observar la respuesta del tratamiento control se comprobó que al no esterilizarse la cápsula fue imposible la germinación, pues la contaminación invadió todo el ambiente del cultivo inhibiendo la respuesta de las esporas.

En cuanto a los segmentos de gametofitos, diferentes respuestas fueron manifestadas ante los diferentes tratamientos de esterilización: Cuando la concentración de hipoclorito es muy baja (0,01%) y con el máximo de tiempo 5 segundos de inmersión, resultaron igualmente contaminados los segmentos de gametofito. Al usar una mayor concentración de hipoclorito (0,5%) en 2 segundos, hubo un cambio de coloración de verde intenso a amarillento, evidenciándose daño en el tejido y perdiéndose todos los explantes. A una concentración de 0,1% de hipoclorito de sodio y 5 segundos de inmersión, el tejido mostró cierta tolerancia. No hubo contaminación inmediata, pero después aparecieron gran cantidad de cianobacterias y algunas bacterias. A la misma concentración de hipoclorito (0,1%) y cumpliéndose 10 segundos de inmersión no hubo cambio de coloración en el tejido vegetal, la contaminación fue retardada, pero a la final se presenta en el entorno de algunos explantes, algas verdes y algunas bacterias. Sin embargo, se observó entre los filidios crecimiento de un protonema a partir del tejido del gametofito.

Se evitó la contaminación; recurriendo al subcultivo de los explantes en cajas de petri con papel de filtro húmedo. Los explantes sobrevivieron a través de riegos continuos, y llegaron a culminar las diferentes etapas de desarrollo.

Patrones de germinación y propagación asexual:

- Hábito *Neckera chilensis* Schimp. Ex Mont (Figura 2a)

Las esporas se observaron hidratadas, con numerosos cloroplastos y gotas de aceite y germinaron en la primera semana. A los seis días, se observaron protonemas de dos a tres células de largo (Figura 2b). Dieciocho días después de la siembra, los protonemas estaban constituidos por 8 a 10 células, aproximadamente (Figuras 2c y 2d). En algunos protonemas, la espora se dividió, posteriormente aparece una célula intercalar, dando origen a una ramificación (Figura 2d). A los 28 días de cultivo, los protonemas lucían como filamentos delgados aún muy poco ramificados, con paredes perpendiculares transparentes (cloronema). A los 58 días de cultivo, los protonemas lucían aún filiformes y las células intercalares comenzaron a dividirse perpendicularmente, formando ramificaciones. Durante esta etapa, algunos protonemas presentaron yemas de los gametóforos (Figura 2c). En este estadio, no se observó la formación de caulonema. Los gametóforos se derivaron de la ramificación secundaria del protonema (Figura 2f) en algunas plantas, luego de la diferenciación del gametóforo (elongación de los entrenudos y diferenciación de filidios), se observan unos rizoides en la parte basal del mismo. Mientras tanto, el protonema de una coloración verde intenso, continuo expandiéndose radialmente sobre el medio de cultivo hasta cubrir la superficie de la cápsula de petri (Figura 2g).

Producción de diásporas desde el protonema: los protonemas de ***N. chilensis*** forman luego de tres meses de cultivo, cuerpos de Brood (braquicitos) para la reproducción vegetativa. Al germinar éstos producen más cloronema y gametóforos (Figura 2h).

- Hábito *Hypopterygium tamariscinum* (Hedí.) Brid (Figura 3a)

La germinación (Figura 3b) se observó a los 20 días, en un punto de la espora, de manera similar al de ***N. chilense***. La ramificación dicotómica del protone-

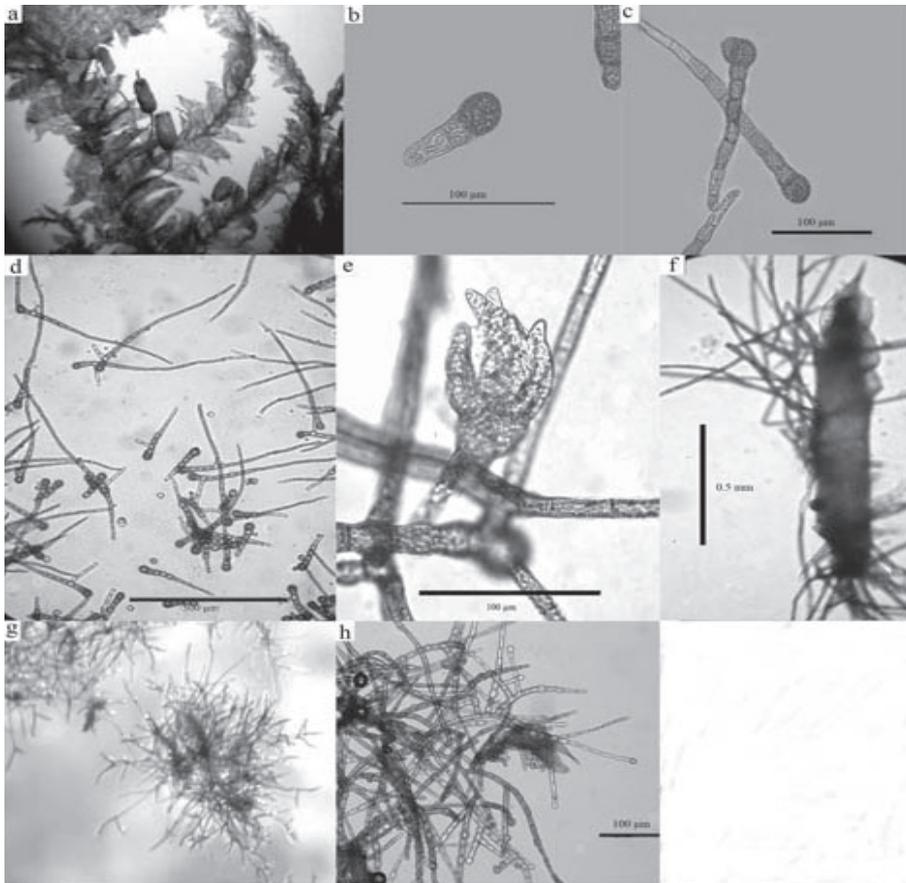


Figura 2. a. *Neckera chilense* a. Hábito. b. germinación de la espóra. c. d, crecimiento y ramificación del protonema. e. f. gametoforo. g. protonema con gametoforos. h. protonema secundario.

ma resultó de la división de la célula basal del mismo (Figura 3c). El cloronema se observó poco ramificado y muy alargado con crecimiento centrifugo. Los gametóforos se produjeron a partir de las ramas secundarias del protonema en ramas del mismo que no están en contacto con el medio de cultivo, en los extremos del protonema circular. (Figura 3d). A los tres meses de cultivo se observaron numerosos gametóforos alargados con rizoides en la base, de continuo crecimiento cuando fueron subcultivados en cajas de petri con papel de filtro húmedo.

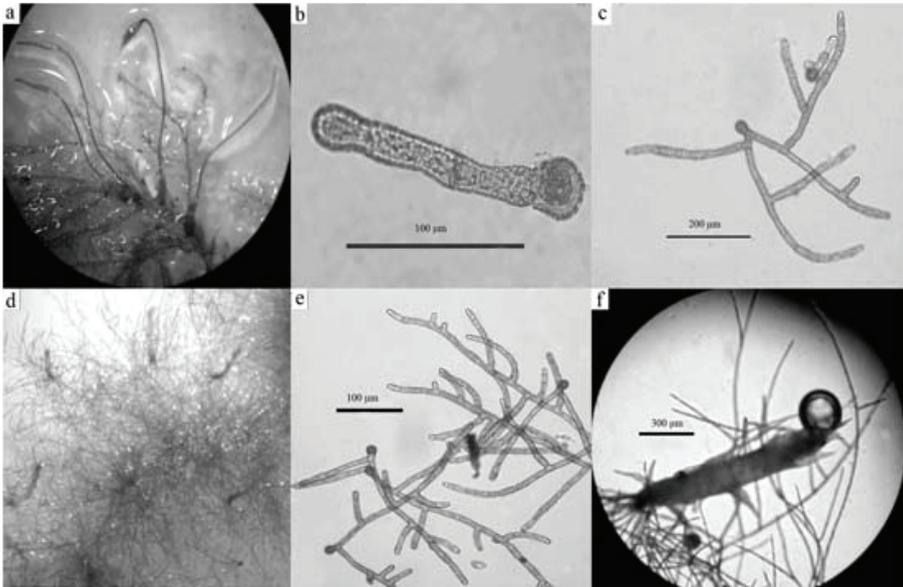


Figura 3. a. Aspecto de la planta, b. germinación de la espora, c. clonema circular, d. protonema ramificado, e. aspecto del gametóforo.

H. tamariscinum alcanzó una total germinación, se observó la producción un buen número de gametóforos a partir de protonema que luego de aislados, presentaron un crecimiento vigoroso con producción de rizoides (Figura 3f), es decir hubo respuesta de micropropagación, al subcultivarlos en medio nutritivo, rápidamente se irguieron y se sostuvieron al sustrato por medio de los rizoides, sin embargo, después de 10 meses aún estos gametofitos no se ramificaron y no adoptaron la apariencia de las plantas adultas.

Micropropagación a partir de fragmentos de gametófito:

El cultivo *in vitro* de los gametofitos de las ocho especies de musgos evaluados resultaron en crecimiento y alargamiento de sus ramas laterales sólo en pocos milímetros después de 10 meses de cultivo (Tabla 2).

El mayor alargamiento de yemas se observó en las especies *Prionodon densus* (Hedw.) Müll (Figura 4a). En *N. chilense* únicamente se observó desa-

Tabla 2. Las respuestas de crecimiento promedio de alargamiento de yemas en segmentos de gametofito bajo condiciones *in vitro*.

ESPECIES	Crecimiento a los cinco meses	Crecimiento a los diez meses	Desarrollo de propagulos
<i>Calypothecium duplicatum</i> (Schwägr.) Broth.	0	0	Presentes y muy desarrollados
<i>Hypopterigium tamariscinum</i> (Hedw.) Brid	0	0	0
<i>Meteorium laevifolium</i> Mitt.	1,91 mm	3.4 mm	ausentes
<i>Neckera chilensis</i> Schimp. Ex Mont.	3,09	3.62 mm	Presentes
<i>Orthostichella muelleri</i> (Dusén) B.H. Allen & Magill	4,09 mm	17,3 mm.	ausentes
<i>Pterobryum densum</i> (Schwägr.) Hornsch	0	0	Presentes sin desarrollo
<i>Prionodon densus</i> (Hedw.) Müll	5 mm	7 mm	ausentes
<i>Squamidium nigricans</i> (Hook.) Broth	3.14 mm	3.6 mm	ausentes

rollo de protonema secundario y rizoide. El crecimiento de las yemas laterales de ***N. chilense*** se efectuó luego de producirse el amarillamiento y senescencia del tejido vegetal, cuando se produce el alargamiento de las yemas vegetativas y a partir de las mismas, se desarrollaron gametofitos con abundantes rizoides que se desprendieron e independizaron formando nuevos individuos. Esto sucede luego de 62 días del cultivo de los fragmentos. Además de la producción de nuevos gametofitos ***N. chilense*** desarrolló protonema secundario (Figura 4b); el gametofito en este caso mostró amarillamiento del tejido, pero la producción de protonema fue de células alargadas verde brillante y ***Orthostichella muelleri*** (Dusén) B.H. Allen & Magill (Figura 4c) con un promedio de 5 mm y 4,09 mm en cinco meses y 2 y 13,2 mm más, en los cinco meses siguientes. Con la observación que los explantes de ***O. muelleri*** produjeron rizoides y alargamiento de yemas. En el mismo tiempo de observación, ***Squamidium nigricans*** (Hook.) Broth (Figura 4d) tuvo un alargamiento de las yemas considerable, mientras que ***Meteorium laevifolium*** Mitt (Figura 4f) los últimos cinco meses llegó a alcanzar un mayor crecimiento. ***Pterobryum densus*** (Schwägr.) Hornsch y ***Calypothecium duplicatum*** (Schwägr.) Broth

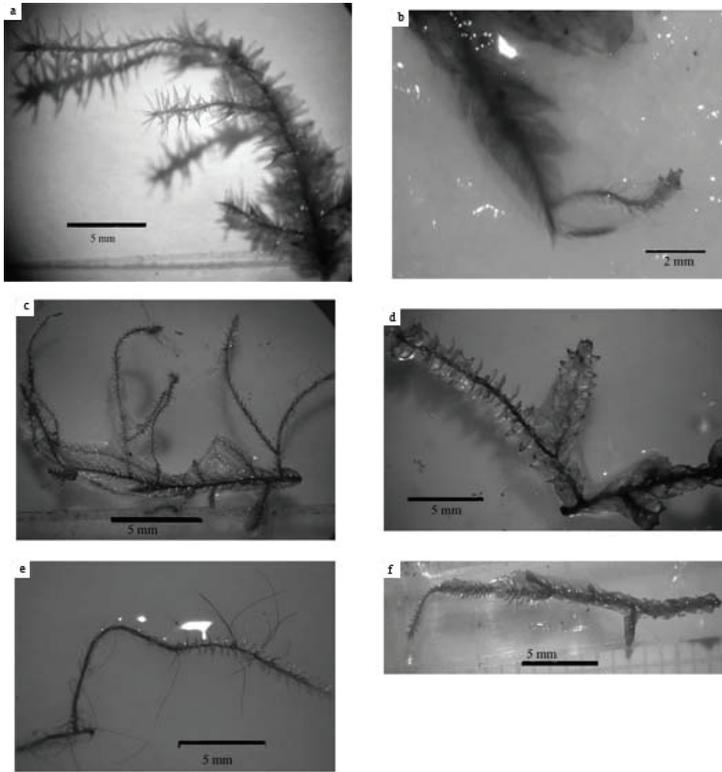


Figura 4. Respuesta de segmentos después de 10 meses de cultivo. a. *Prionodon densus*, b. *Neckera chilense* con rebrote, c. *Orthostichella muelleri*, con alargamiento de yemas laterales, d. *Squamidium nigricans* con alargamiento de yema, e. *Calyptothecium duplicatulum* obtenido a partir de los propágulos, f. *Meteorium laevifolium* con alargamiento de yema.

ambas de la familia Pterobryaceae no tuvieron alargamiento de yemas. No obstante, *Calyptothecium duplicatulum* se reproduce bien por medio de propágulos como se explica a continuación y se ilustra en la Figura (4e), mientras que para *Hypopterygium tamariscinum* (Hedw.) Brid; aislando el mismo tipo de explante, no se obtuvo la propagación vegetativa.

Vale la pena señalar que a pesar de la contaminación de los segmentos, éstos aún mostraron crecimiento a partir de ramas laterales y produjeron rizoides fijándose al sustrato.

Los propágulos de *Calyptothecium duplicatum* (Figura 5a) alcanzaron propagarse en condiciones controladas. La mayoría de los propágulos respondieron, gametofitos con rizoides en la base, que se desprendían fácilmente. (Figuras 5b, 5c y 5d). Los fragmentos de gametofitos presentaron también zonas con abundantes células, estos parecían provenir de zonas de densa actividad celular por debajo de los filidios (meristemoides) (Figuras 5e y 5f). Se observaron grupos de células incoloras (Tmema) que produjeron los propágulos clorofilosos de unas 15 células de largo (Figura 5h). A los seis meses de cultivo, se observan numerosos de estos rebrotes, alargando yemas axilares (Figura 5g). De cinco segmentos de gametofitos, se obtuvieron 16 plántulas (consistentes en caulidio, filidios y rizoides) (Figura 5i). También produce dos tipos de rizoides (Figuras 5e y 5f), se pudieron observar todas las

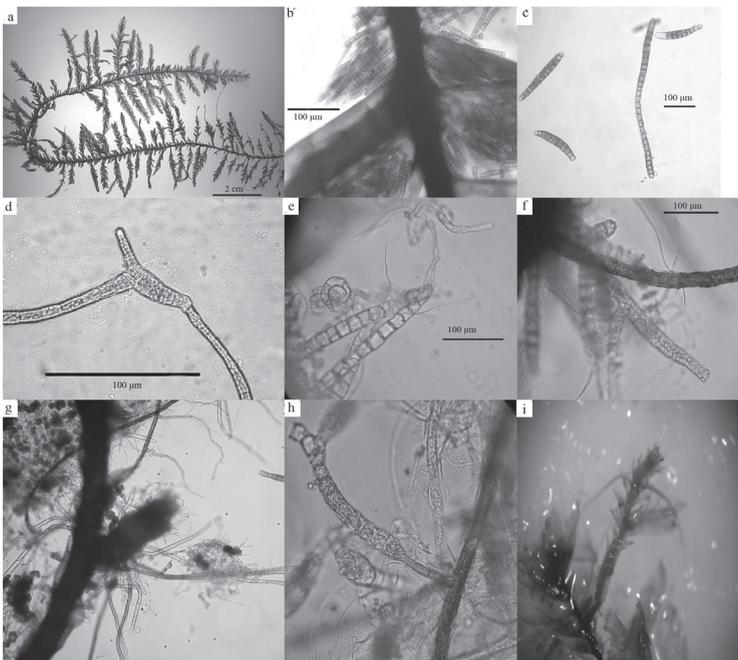


Figura 5. *Calyptothecium duplicatum* a. Aspecto de la planta, b. propágulos, c. d. Germinación de los propágulos. e. rizoides lisos, f. rizoides rugosos, g. yema. h. propágulo germinado. i. nueva planta a partir de una yema lateral

estructuras en una pequeña porción de talo. Los rizoides observados podían ser pequeños, curvos y transparentes, con paredes oblicuas, o con paredes celulares engrosadas de color ocre y engrosamientos verrucosos (Figura 5f). En un mismo filamento, se observaron los propágulos que originaron el clonema filamentosos y las yemas. *P. densus* presentó propágulos alargados como los de *C. duplicatum*.

Discusión

Se obtuvieron resultados óptimos de esterilización de cápsulas, lo que a su vez propició una excelente germinación. Duckett *et al.*, (2004) implementaron un similar tratamiento de esterilización, pero, un mayor tiempo de inmersión y concentraciones más altas de hipoclorito de sodio. Inicialmente, en esta investigación, se recurrió al mismo tratamiento de esterilización establecido en el protocolo de los autores citados, resultando necrosis de los tejidos vegetal y cápsulas de las especies de musgos en estudio, por lo que se experimentó con tiempo y concentraciones menores.

La experiencia señala que la esterilización adecuada del tejido vegetal es aquella que se efectúa a un menor tiempo de inmersión del explante y a una menor concentración de la solución de esterilización, evitando en lo posible la necrosis, cualquier daño al tejido, o la proliferación de patógenos, que impiden el desarrollo de los explantes. Hecho que sin duda marca pauta en la respuesta del cultivo.

A diferencia de la esterilización de cápsulas, en los ensayos de propagación vegetativa no se logró una efectiva esterilización, en los segmentos de gametofitos, tejido vegetal utilizados como explantes, se alcanzó retardar su contaminación utilizando hipoclorito al 0,1% y sumergidos durante 10 segundos.

La incidencia de contaminación observada también ha sido reportado por Sabovljevic *et al.* (2003) y Duckett *et al.* (2004) quienes señalan el bajo resultado de estos cultivos, en los cuales es frecuente que los explantes de musgos mueran en el proceso de esterilización o bien en el de contaminación, dada la delicada naturaleza del tejido gametofítico. No obstante, a pesar de la contaminación inicial, cuando se subcultivaron los explantes sin medio nutritivo, pero se les mantuvo riego continuo, hubo respuesta de micropropagación.

En el caso de los briófitos, hay dos factores que contribuyen a la contaminación del cultivo, por un lado, la fragilidad del tejido que al carecer de cutícula es muy vulnerable durante la esterilización, y por otra parte la estrecha relación de los briofitos con otros microorganismos que no son eliminados por completo con el método de esterilización, y al ser colocados en medios ricos compiten con el explante. El fenómeno de resistencia del tejido de los briófitos en presencia de hongos y líquenes ha sido mostrado por Frahm *et al.* (2000) en un estudio de los efectos alelopáticos entre líquenes y briófitos en el trópico, y es probable que dicha resistencia sea el resultado de la adaptación de estos organismos que viven en estrechas comunidades epífitas, pero bajo condiciones poco favorables para la proliferación de los microorganismos.

En general, el crecimiento del protonema en *N. chilense* y *H. tamarascinum* es similar al de otras especies epífitas como *Cryphaea* estudiadas previamente (León, 1999). El patrón de emergencia del protonema es similar al de los pelos radicales y al de los tubos polínicos de las plantas vasculares (Christianson, 1996).

Aunque la germinación en *N. chilense* y *H. tamarascinum* es rápida (entre tres y ocho días de iniciado el cultivo), el crecimiento de los gametóforos en los dos casos es lento.

En *N. chilense* los propágulos derivados de la reproducción asexual pueden ser más exitosos para el establecimiento rápido de las poblaciones, ya que se producen fragmentos más grandes y resistentes que aquellos originados por reproducción sexual.

El patrón de germinación en *N. chilense* y en *H. tamarascinum* y los primeros estados de crecimiento de los protonemas es similar al de musgos pleurocárpicos asiáticos estudiados por Nehira (1976) *Campyllum sommerfeltii* (Myrin) Lange, *Isopterygium albescens* (Hook.), *Homomallium connexum* (Cardot) Broth. A. Jaeger. *Macromitrium gymnostomum* Sull. & Lesq. y para *Lindbergia brachyptera* (Mitt.) Kindb., un musgo distribuido en EUA, Canadá y China y estudiado por Zhao *et al.* (2004). Todas estas especies son epífitas y al menos en los estadios tempranos los protonemas tienen similitud a los encontrados en este estudio. Los tiempos de germinación y de la producción de las yemas vegetativas de varias especies terrestres y epífitas llevadas a cabo por (Sabovljevic *et al.*, 2003), también resultaron muy similares.

Aparentemente la morfología de los protonemas y los tiempos de germinación son independientes del origen geográfico de las especies o si de estas son de clima templado o tropical, sin embargo todas estas especies tienen en común el sustrato en el que crecen y su forma de vida pleurocárpica.

Los cuerpos de Brood se producen una vez que el medio se ha agotado, y han sido reportados en otras especies de musgos adaptadas a períodos de estrés hídrico, e incluso en especies dependientes de hábitats particulares como *Splachnum ampulaceum* que vive en excremento de animales y cuyas esporas o propágulos son transportados por insectos (Mallón *et al.*, 2006). La función de estas diásporas es probablemente permanecer en reposo hasta que las condiciones ambientales cambien y permitan el desarrollo de un nuevo protonema.

La reproducción asexual *in vitro* de *C. duplicatum* observada, por medio de propágulos hace suponer que esta especie, a pesar de no presentar crecimiento a partir del fragmento, es una especie pionera, es una buena colonizadora, dados los diferentes tipos de propágulos que produce, con los que tiene más oportunidad de establecerse. Por el contrario, *P. densus*, a pesar de tener un tipo similar de propágulos a los de *C. duplicatum*, los propágulos no germinaron con el método de cultivo utilizado en este trabajo. De acuerdo con Churchill & Linares (1995) y Churchill (2008) en la página web de los musgos de los Andes (MO), *C. duplicatum* es una especie menos frecuente que *P. densum* al que refieren como especie frecuente. Por lo que aún queda por establecer el mecanismo de propagación utilizado por *P. densus*.

En esta investigación, los resultados de la propagación vegetativa *in vitro* no implican altas tasas de crecimiento de las especies; no obstante, indica la factibilidad de colonización de fragmentos de gametofito. Es de hacer notar que de las ocho especies cultivadas por fragmento de gametofito *C. duplicatum*, *H. tamarascinum* y *P. densus* no mostraron ningún crecimiento a pesar de que el tejido permaneció vivo. Esto puede ser explicado de varias maneras, entre las que hay que evaluar si las especies se reproducen eventualmente de manera sexual o si estas requieren de otras condiciones de cultivo. Por supuesto, cada una de las especies estudiadas tiene una estrategia diferente para la propagación, los tiempos observados indican que las especies de crecimiento vegetativo más rápido son perennes, mientras

que las que se reproducen por esporas corresponden a especies pioneras de establecimiento rápido.

En el caso de *M. laevifolium* *N. chilensis* *O. muelleri*, la respuesta de propagación a partir del desarrollo de la yema axilar fue positiva. Se presume entonces que estos fragmentos son capaces de establecerse, de ocurrir la fragmentación en campo.

Sin embargo, sí la respuesta de crecimiento observada en las especies estudiadas de musgos bajo condiciones de laboratorio son similares a las ocurridas en el campo, se confirma lo dicho por Duckett *et al.* (2004), hay pocas probabilidades de recuperar la biomasa en corto tiempo. Estos resultados coinciden con los de Jacobsen (1978), quien al estudiar el crecimiento de briófitos de bosques nublados africanos reportó un crecimiento muy lento, con una recuperación de la biomasa extraída a partir de los siete años, luego de la extracción original. Por lo antes expuesto, las extracciones anuales recurrentes de los musgos que se realizan en los Andes de Venezuela, seguramente está causando un gran impacto ambiental, llegando alterar muchos de los ecosistemas del bosque y páramos.

Conclusiones

1. Fue estandarizado un protocolo de cultivo *in vitro* para especies de musgos comunes de la selva nublada andina venezolana, resultando una exitosa germinación y micropropagación, a partir de segmentos gametofíticos, que permitió el seguimiento de: crecimiento, diferenciación de los tejidos hasta el desarrollo de una planta completa bajo condiciones controladas.
2. Entre las especies estudiadas, existen diferencias en la longitud de alargamiento de yemas, distinguiéndose *O. muelleri* con una longitud promedio de 13,2 mm y presenciando rizoides al cabo de un año de cultivo, obteniéndose finalmente una microplántula.
3. La recuperación de los musgos ante la extracción anual es lenta, sí los patrones de crecimiento observados en el laboratorio son semejantes a los ocurridos en la naturaleza.

4. La extracción indiscriminada de los musgos induce a un gran impacto ambiental.

Agradecimientos

Este trabajo contó con el apoyo institucional del laboratorio de cultivos in vitro y del Centro Jardín Botánico de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. El CDCHT-ULA (proyecto C-1359-05-01-B) financió la realización de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

- ALLSOP, A. G., & MITRA, C. 1958. The morphology of protonema and bud formation in the Bryales. *Ann Bot. London* 22: 95-115.
- BRUIJNZEEL L. A. y HAMILTON, L. S. 2001. *Tiempo decisivo para las selvas de neblina. Asuntos y problemas relacionados con el agua en los trópicos húmedos y otras regiones cálido húmedas*. IHP Programa Trópicos Húmedos. Serie N° 13. UNESCO, UICN y DFID. 40 p.
- CHRISTIANSON, M. 1996. Morphogenesis and the coordination of cell division in the bryophytes. *Seminars in Cell & Developmental biology* 6:881-889.
- CHURCHILL, S. P. 2008. *Los musgos de los Andes*. <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/andes/>
- CHURCHILL, S. P. y LINARES C., E. 1995. *Prodromus Bryologiae Novo-Granatensis. Introducción a la Flora de Musgos de Colombia*. Instituto de Ciencias Naturales. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional de Colombia.
- DECKER, E. L., FRANK, W., SAMIGHAUSEN, E. and RESKI, R. 2006. Moss systems Biology en Route: Phytohormones in Physcomitriella development. *Plant. Biol.* 8: 397-406.
- DUCKETT, J. G., BURCH, J., FLETCHER, P. W., MATCHAM, H. W., READ, D. D., RUSSEL A. J. and PRESSEL, S. 2004. *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. *Journal of Bryology* 26: 3-20.
- DURING, H. J. & VAN TOOREN, B. F. 1987. Recent developments in bryophyte population ecology. *Tree*. 24: 89-93.

- FRAHM, J. 1990 Bryophyte phytomass in tropical ecosystems. *Bot. J. of Linnean Soc.* 104:23-33.
- FRAHM, J., SPECHT, A., REINFENRATH, K. and LEÓN VARGAS Y. 2000. Allelopathic effects of crustaceous lichens on epiphytic bryophytes and vascular plants. *Nova Hedwigia* 70:245-254.
- JACOBSEN, N. H. G 1978. An investigation into ecology and productivity of epiphytic mosses. *Journal of South African Botany* 44:297-312.
- KLEKOWSKI JR. E.J. 1969. Reproductive biology in Pteridophyta II. Theoretical considerations. *Botanical Journal of the Linnean Society* 62:347-359.
- LEÓN V., Y. 2006. Cell wall structure of selected epiphytic mosses from a montane forest in the Venezuelan Andes. *Cryptogamie, Bryologie* 27:421-432.
- LEÓN V. Y., ENGWALD, S. & PROCTOR, M. 2006. Microclimate, light adaptation and desiccation tolerance of epiphytic bryophytes in a Venezuelan cloud forest. *Journal of Biogeography* 33, 901-913.
- LEÓN V. Y and USSHER, M. S. 2005. Educational campaign directed towards the preservation of Venezuelan Andean Bryophytes. *Hattori Botanical Laboratory Journal. Japón.* 97: 227-231.
- LEÓN V. Y y RICO, R. 2003. Briofitos. En Aguilera, M., A. Azocar, E. González (Eds.). *La diversidad biológica en Venezuela* pp. 122-135. Ediciones Fundación Polar. Caracas. Venezuela.
- LEÓN V. Y. 1999. Germinación de esporas y desarrollo de protonemas de *Cryphaea jamesoni* Tayl. (Cryphaeaceae: Musci) in Vitro. *PlantULA* 2(3).
- MALLÓN R., REINOSO, J., RODRÍGUEZ O., J. and GONZÁLEZ, M. L. 2006. In Vitro development of vegetative propagules in *Splachnum ampulaceum*: Brood cells and chloronematal bulbils. *The Bryologist* 109 (2):215-223.
- NEHIRA, K. (1976). Protonemata development in mosses. *J. Hattori Bot. Lab.* 41:157-165.
- ODU, E. A. 1981. Spore germination in two tropical mosses: *Fissidens sp.* and *Racomitrium sp.* *Cryptogam. Bryol. Lichenol.* 2:91-99.
- SABOVLJEVIC, M., BIJELOVIC, A. and DRAGICEVIC, I. 2003. In vitro culture of mosses: *Aloina aloides* (K. F. Schultz) Kindb., *Brachythecium velutinum* (Hedw.) B.S. & G., *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., *Eurhynchium* (Hedw.) B.S.G. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Turk. J. Bot.* 27:441-446.
- ZHAO, J. C., HUANG, S. L., MAMTIMN, M. LL.S, HE, J., ZHANG, Y.M. & LI, X. 2004. A study on the characteristics of spore germination and protonemal development in *Lindbergia brachyptera*. *Arctoa* 13: 223-228.