



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

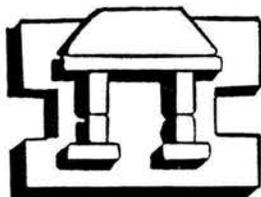
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MICROPROPAGACION DE *Tillandsia erubescens*. var  
*erubescens* Schltdl. (BROMELIACEAE):  
MULTIPLICACION A PARTIR DE APICES DE TALLO  
E INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE  
SACAROSA EN LA GERMINACION.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRIA EN BIOLOGIA DE**  
**RECURSOS VEGETALES**  
P R E S E N T A :  
**MARIA ELENA HUIDOBRO SALAS**

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. ERNESTO AGUIRRE LEON



IZTACALA

MEXICO, D. F.

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



U.N.A.M. FES  
IZTACALA

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES GENERALES.....	6
RASGOS CARACTERÍSTICOS DE LA ESPECIE .....	9
CULTIVO DE TEJIDOS DE BROMELIACEAE .....	11
OBJETIVOS. ....	16
METODOLOGÍA .....	17
GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE SEMILLA .....	17
MÉTODO DE MEDICIÓN DE CLOROFILA EN TEJIDO INTACTO .....	20
MEDICIÓN DE SACAROSA A TRAVÉS DEL MÉTODO DE ANTRONA .....	21
CORTES HISTOLÓGICOS .....	22
CORTES DE HOJAS DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> .....	22
CORTES DE CALLO DERIVADO DE APICES DE TALLO.....	23
CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES DE TALLO .....	24
ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS DERIVADAS DE ÁPICES DE TALLO.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
GERMINACIÓN .....	28
SUPERVIVENCIA .....	31
PESO FRESCO DE PLÁNTULAS CULTIVADAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA .....	33
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LÁMINAS FOLIARES DE PLÁNTULAS CON 12 SEMANAS DE DESARROLLO .....	37
CUANTIFICACION DE SACAROSA EN TEJIDO INTACTO.....	51
ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS OBTENIDAS DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS .....	54
CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILA EN TEJIDO FRESCO .....	58
CULTIVO DE PLÁNTULAS DERIVADAS DE APICES DE TALLO .....	62
NÚMERO DE BROTES .....	62
PESO HUMEDO DE BROTES.....	64
CRECIMIENTO APICAL.....	68

ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS DERIVADAS DE APICES DE TALLO .....	74
FORMACIÓN DE CALLOS .....	77
CONCLUSIONES .....	79
BIBLIOGRAFÍA .....	97

CON TODO MI AMOR PARA  
GUILLERMO Y MARIANA POR SER  
MI RAZÓN Y MI ALEGRÍA.

A LA MEMORIA DE LOS QUE YA  
NO ESTAN CONMIGO PERO QUE ME  
DEJARON LA EXPERIENCIA DE  
VIDA Y UN MOTIVO PARA SEGUIR  
ADELANTE.

A MI PADRE Y HERMANOS.

A MI BELLA CHALI

AGRADECIMIENTOS

**AL M. EN C. ERNESTO AGUIRRE LEÓN POR SU ASESORIA, APOYO INCONDICIONAL Y POR TODO EL TIEMPO QUE DEDICO A ESTE TRABAJO.**

**A LA DR. SILVIA AGUILAR RODRIGUEZ POR SU APOYO EN LA PARTE HISTOLOGICA Y SUS ATINADAS SUGERENCIAS.**

**AL M. EN C. JOSÉ DEL CARMEN BENITEZ FLORES POR SU COLABORACION EN LOS CORTES HISTOLOGICOS DE CALLO.**

**AL BIOLOGO AGUSTIN VARGAS POR SU ASESORIA EN LA PARTE ESTADÍSTICA Y POR SUS SUGERENCIA.**

**MUCHAS GRACIA A MIS REVISORES POR TODAS SUS OBSERVACIONES HECHAS AL TRABAJO  
DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO, DR. JORGE SARQUIS, MTRA. ESTELA SANDOVAL DR. VICTOR CHAVEZ Y MTRO. ERNESTO AGUIRRE LEÓN.**

**UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL A LA BIOL. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO POR SU COMPRENCION Y APOYO DESINTERESADO.**

**MUCHAS GRACIAS ADRIANA MONTSERRAT ESPINOZA GONZALEZ POR TODAS LAS AYUDAS EN DETALLES E IMÁGENES Y OTRAS COSAS MÁS.**

**GRACIAS AL BIOL. MIGUEL, AL BIOL. PETER Y AL EQUIPO DEL CRAPA POR TODA LA AYUDA EN LA PREPARACION Y PRESENTACION DEL TRABAJO.**

**A TODAS MIS AMIGAS Y AMIGOS POR ESTAR CONMIGO EN TODOS LOS MOMENTOS BUENOS Y MALOS.**

**SIN DUDA SIEMPRE FALTARA ALGUNO, PERO QUIERO A GRADECER A TODOS LOS QUE DE ALGUNA MANERA INTERVINIERON EN ESTE TRABAJO.**

**AFECTUOSAMENTE MARIA ELENA HUIDOBRO SALAS.**

## **ABREVIATURAS USADAS**

### REGULADORES DE CRECIMIENTO.

AIA- Ácido indolacético.

AIB- Ácido indolbutírico.

ANA- Ácido naftalenacético.

ANIA- p- Nitrofenil indolacético ester.

BAP- Bencil-aminopurina.

GA- Ácido giberélico.

KIN- Cinetina.

2iP-6 γγ dimetilalilaminopurina.

### MEDIOS Y TRATAMIENTOS.

KC- Knudson C. (Knudson, 1946)

MS- Murashige-Skoog. (Murashige y Skoog, 1962)

K0- Knudson C ( 4128) con 0% de sacarosa.

K3- Knudson C (4128) con 0.3% de sacarosa.

K6- Knudson C (4128) con 0.6% de sacarosa.

K15- Knudson C (4128) con 1.5% de sacarosa.

K20- Knudson C (4128) con 2% de sacarosa.

EPON-802. Resina usada en el montaje de preparaciones para  
microscopia electrónica.

PC Plantas en crecimiento (4 cm).

PF Plantas en floración

TTC- Cloruro de Trifeniltetrazolio

### SOCIEDADES DE CONSERVACION

CITES Convención sobre comercio internacional de especies amenazadas  
de fauna y flora silvestre.

FFPS, ahora FFI Sociedad de Preservación de Flora y Fauna.

TRAFFIC Análisis del Registro de Mercadeo y Trafico de Flora y Fauna.

## REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores u hormonas por definición son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las mismas. En conjunto se les denomina reguladores de crecimiento y pueden ser de origen natural o sintético. En el cultivo *in vitro* son indispensables para la elongación o división celular por lo que su uso se ha generalizado.

Los reguladores usados en este trabajo fueron auxinas y citocininas, de las primeras tenemos que el IAA se produce de forma natural en las plantas, que 2,4-D, IBA, y ANA son sintéticos, por lo tanto más activos y se requiere de concentraciones mínimas para su acción. Las auxinas generalmente provocan elongación celular expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), formación de raíces adventicias y embriogenesis en los cultivos en suspensión. Las bajas concentraciones de auxinas forma raíces y las altas callo.

En este trabajo fueron usadas ANA e IBA para propiciar el enraizamiento y ANA junto con BAP para promover la formación de brotes axilares.

Las citocininas estimulan el crecimiento y desarrollo de los tejidos, las más comunes son la cinetina, BA 2iP y BAP que estimulan el crecimiento celular sobre todo si van acompañadas de auxinas. En concentraciones altas ( de 1 a 10 mg/l) causan la formación de brotes axilares al disminuir la dominancia apical y también retardan el envejecimiento celular propiciando un estado de juvenilidad.

## RESUMEN

El riesgo ecológico de especies de *Tillandsia*, aunado a su lento crecimiento, condujo a proponer una metodología de micropropagación *in vitro* de *Tillandsia erubescens* var. *erubescens* a partir de semilla y ápices de tallo con fines de conservación *ex situ*. La viabilidad fue determinada mensualmente por germinación directa y el método de cloruro de trifenil tetrazolio. Se evaluaron requerimientos de sacarosa en la germinación y el desarrollo temprano de las plántulas, se determinaron tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento que promovieron el desarrollo de ápices de tallo. La sacarosa adicionada al medio (Knudson C) en concentraciones de 1.5% a 2% fue determinante en procesos de supervivencia y organogénesis traduciéndose en mayor peso, contenido de clorofila, capacidad de enraizamiento. Se efectuó un estudio histológico paralelo de tejidos y se determinaron azúcares totales por el método de antrona. Los ápices de tallo se cultivaron en Murashige-Skoog con ocho combinaciones de ácido naftalenacético y bencil-aminopurina. Se estimaron crecimiento, brotes laterales, callo, oxidación, hiperhidratación y regeneración de raíces. Bencil-aminopurina de 0.5 a 1 mg/l permitió el desarrollo de hasta diez brotes por explante, mientras que ácido naftalenacético en 1mg/l promovió enraizamiento. Con semillas almacenadas en condiciones ambientales la germinación ocurrió en el lapso de ocho meses y es independiente de la sacarosa, ésta contenida en el medio influyó en la supervivencia y en eventos organogénicos. La técnica por ápices de tallo acortó el tiempo de desarrollo de plántulas, pero requiere control, riguroso del uso de reguladores de crecimiento.

## INTRODUCCION

El género *Tillandsia* pertenece a la familia Bromeliaceae, que reúne a monocotiledóneas con carácter neotropical, originarias de Sudamérica y nativas casi en su totalidad del continente americano. La familia está constituida por tres subfamilias, Pitcairnioideae, Tillandsioideae, y Bromelioideae, que se separan taxonómicamente por diferencias en sus mecanismos reproductores, tipo de semilla y arquitectura vegetativa general así como por su hábitat ecológico (Smith y Down, 1974). Sus miembros ocupan diversos hábitats, son organismos muy especializados y sus flores han evolucionado explotando diferentes agentes polinizadores. De las 40,000 monocotiledóneas, sólo las Bromeliaceae poseen una particular combinación de semillas y tricomas foliares, muy diferentes morfológicamente y sin comparación con otras familias. Estos organismos se reproducen sexualmente por semillas y vegetativamente por brotes laterales, los cuales aparecen generalmente después de la floración (Benzing, 1980).

Varios miembros de la familia son conocidos desde tiempos precolombinos y la piña (*Ananas comosus*), era cultivada por los nativos de la isla Guadalupe antes de la llegada de los españoles. Se estima que la domesticación de la piña data del siglo XIII. En Europa el fruto fue conocido después del segundo viaje de Cristóbal Colón, en 1493; en ese tiempo, la piña fue la única Bromeliaceae que llamó la atención de los descubridores (Benzing, op cit.; Williams y Hedges, 1990 y Sloan, 1992;).

El interés de coleccionistas y horticultores por las Bromeliaceae se inició en el siglo XVIII, cuando la primera bromeliácea ornamental,

*Guzmania lingulata*, fue introducida en Europa. En 1753 Linneo reportó en su "Species Plantarum", 14 plantas conocidas de la familia Bromeliaceae. Para 1811 había 16 especies en los Jardines Botánicos de la Universidad de Inglaterra y en 1887, el Jardín Botánico de Alemania reportó 334 especies de Bromeliaceae cultivadas en sus instalaciones (Padilla, 1985).

El interés por las bromeliáceas y sus productos incluye, además del alimenticio, el ornamental, el textil y el médico, al respecto de este último, la enzima bromelina (extraída de la planta de la piña) se usa ampliamente en el tratamiento de la dispepsia o como desinflamatorio. Algunas Bromeliaceae son utilizadas en prácticas de medicina tradicional usándose; *Tillandsia recurvata* como febrífugo; *Ananas comosus* y *Bromelia pinguin*, como vermífugos y diuréticos; *A. comosus* como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes y *Tillandsia usneoides* por sus cualidades antibióticas y cicatrizantes. Algunas tienen usos textiles por las fibras de alta resistencia que producen, aunque en la actualidad estas fibras han sido sustituidas por materiales sintéticos. Con las fibras de *Bromelia karacatas* se producían las cuerdas para la marina norteamericana, otras bromeliáceas no han dejado de ser apreciadas y sus hilos se utilizan en bordados de sotanas religiosas, trajes y accesorios de charrería. La especie *Aechmea magdalenae* es usada para la producción del hilo de "Pita" con el que se realizan bordados y cinturones y las hojas de *Ananas comosus* han sido utilizadas como materia prima para la producción de papel de alta calidad con propósitos bancarios, principalmente en Taiwan y también con sus fibras se producen hilos muy apreciados para bordados finos en Filipinas (Huidobro 1988).

Algo que estimula el interés general por la familia es el particular modo de vida que muchas de ellas poseen, algunas son terrestres otras epífitas ó rupícolas. También llama la atención la diversidad morfológica que muestran, su belleza vegetativa y floral las hacen únicas entre otras plantas.

De manera particular, en la subfamilia Tillandsioideae el género *Tillandsia* está constituido en su mayoría por epífitos por lo que se les ha llamado "plantas del aire". Este género cuenta con aproximadamente 460 especies conocidas, las cuales se distribuyen a lo largo del continente americano desde el sur de Estados Unidos de Norte América hasta Argentina. Podemos encontrarlas en selvas húmedas, selvas bajas caducifolias, bosques mesófilos, bosques de coníferas y en zonas semidesérticas y desde el nivel del mar hasta los 3500 metros de altitud (Smith, 1977). México cuenta con gran diversidad de especies de *Tillandsia*, según Espejo y López Ferrari. (1994) se han reportado 189 especies que constituyen el 41% del género, algunas especies tienen una amplia distribución geográfica, otras muestran un marcado endemismo y están restringidas a ciertas zonas del territorio nacional.

Hay muchas especies de *Tillandsia* que por su belleza tienen valor ornamental y son muy apreciadas por coleccionistas y cultivadores. Se calcula que sólo el 1% de las especies comercializadas provienen del cultivo formal y el resto son extraídas de sus ambientes naturales, ésta práctica a puesto en peligro a muchas especies como las que incluyó en su lista general la CITES (Convención sobre comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre) en 1992. En un principio se pensó que todo el género *Tillandsia* debía estar incluido en la lista de organismos en riesgo,

pero finalmente se consideraron sólo a *T. harrissii*, *T. kammii*, *T. kautskyi*, *T. mauryana*, *T. sprengeliana*, *T. sucrei* y *T. xerographica*, (Sloan, 1992 ; Luther, 1994-1995).

El destino de los epífitos está unido al de los ambientes que las albergan, por lo que la destrucción de bosques y selvas va seguida de toda la comunidad acompañante. Por otro lado, en México el Diario Oficial de la Federación del 16 de mayo de 1994 menciona 22 especies de la familia Bromeliaceae en riesgo; de éstas, 19 están amenazadas, tres son raras y 16 especies son del género *Tillandsia* y son endémicas de alguna región del país. El género agrupa especies como *T. erubescens* con desarrollo muy lento y semillas que difícilmente prosperan en cultivos convencionales, por lo que el cultivo *in vitro* ofrece una buena alternativa en la propagación de las mismas.

## **ANTECEDENTES GENERALES**

El cultivo de las bromeliáceas causó gran interés desde el siglo XVIII. Éste se ha realizado comúnmente a través de propagación vegetativa ó por germinación de semillas. Sin embargo, no todas las especies de la familia presentan la misma capacidad reproductiva. Como ya se mencionó, existe un gran número de bromeliáceas de interés ornamental entre las que podemos encontrar especies de los géneros *Aechmea*, *Bilbergia*, *Canistrum*, *Cryptantus*, *Guzmania*, *Neoregelia*, *Nidularium*, *Pitcairnia*, *Portia*, *Tillandsia*, *Vriesea* y *Wittrockia*. En el siglo XIX El cultivo de las especies de la familia estaba restringido a invernaderos y el costo de los mismos sólo podía ser mantenido por la aristocracia. Aun así, el cultivo de estas especies ornamentales tuvo gran auge y se realizaron algunos trabajos de hibridación

creándose nuevos tipos en los que se fijaron caracteres apreciados por los horticultores. Durante el siglo XX el interés hortícola se reanudó sólo después de la Segunda Guerra Mundial (Benzing, 1980; Padilla, 1985).

En 1935 cultivadores y estudiosos como Multon Foster y su esposa introdujeron un buen número de nuevas bromeliáceas a los Estados Unidos de Norte América, llegando a tener una colección de más de 200 especies. Su entusiasmo y la colección de más ejemplares fueron la motivación para formar la primera agrupación civil dedicada al cultivo de las bromeliáceas en Los Ángeles, California, en 1950 (Benzing, 1980; Williams y Hedges, 1990).

Actualmente el cultivo de las bromeliáceas se ha extendido a varias ciudades de la Unión Americana y otros países europeos, entre los que destacan Alemania y particularmente Holanda con una alta producción de plantas de la familia; tan sólo de *T. cyanea* se producen medio millón de plantas anualmente (Pierik y Sprenkel, 1991). En Inglaterra la Sociedad Británica de Bromeliáceas ha publicado diversos libros sobre las especies de interés ornamental como el de Rauf (1979). También existen agrupaciones de cultivadores en Australia e Islas del Pacífico (Phillips, 1980).

El cultivo de muchas de las bromeliáceas como ya se mencionó puede realizarse por semillas, existiendo una buena y rápida respuesta en géneros como *Aechmea*, *Bilbergia*, *Dyckia* y *Puya*, pero en el caso de *Tillandsia*, la propagación por semilla no es muy exitosa ya que presentan un desarrollo muy lento, alcanzándose la madurez de la planta sólo después de 5 a 8 años, dependiendo de la especie (Pippin, 1984; Sloan, 1992). Cabe mencionar a Oeser con sus trabajos de 1953- 1977 y 1991, en los que describió algunos

métodos de propagación de bromeliáceas a partir de semilla y mencionó los problemas con la propagación de *Tillandsia*. La dificultad en el cultivo de muchas especies de *Tillandsia* ha provocado que sean extraídas de sus ambientes naturales y en pocos casos la propagación vegetativa ha sido la alternativa para algunas especies. El género *Tillandsia*, con aproximadamente 460 especies, es probablemente el más afectado por éste saqueo y la FFPS ahora FFI, (Sociedad de preservación de flora y fauna), TRAFFIC, (Conservación y comercio de flora y fauna no amenazadas) y la CITES (Convención sobre comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre) señalan que el 70% de las especies vendidas provienen de ambientes naturales. De éste porcentaje el 54% tienen como destino Alemania, el 12% USA y sólo 4% van a sociedades de conservación, el resto son vendidas localmente en sitios cercanos a su ambiente natural (Williams, y Hudges, 1990). La población silvestre de Bromeliaceae está en riesgo por la demanda creciente de los consumidores. De las 2000 especies sólo el 1% son cultivadas formalmente y según algunos especialistas, el 95% de las especies tendrían posibilidades comerciales, por lo que un programa de cultivo constituye una buena alternativa para el correcto aprovechamiento de especies ornamentales y la conservación de otras en sus ambientes naturales.

Por otro lado, Alemania está trabajando en conjunto con instituciones Guatemaltecas, a través de la Convención de Conservación, para establecer técnicas de propagación por semilla o vegetativa, de algunas especies de interés ornamental. México hasta 1990 no formaba parte de ninguna convención, actualmente nuestro país ya está adscrito a CITES, pero independientemente de la

reglamentación vigente se hace necesario implementar programas de conservación y manejo de los recursos naturales de nuestro país.

*Tillandsia erubescens* Schltdl. (Fig.28) es una epífita o rupícola mexicana muy atractiva, que durante mucho tiempo fue conocida como *T. benthamiana* Klotz. ex Baker, actualmente considerada sinónimo (Weber, 1981). *T. erubescens* junto con otras especies del género es utilizada como planta de ornato y vendida en los mercados locales, principalmente en festividades religiosas (Gardner, 1982). Como la mayoría de las especies del género, no se cultiva formalmente y la destrucción de los bosques de encino donde habita, afecta directamente su supervivencia.

Debido a que se carece de estudios de micropropagación sobre las especies de *Tillandsia* mexicanas, se eligió a *T. erubescens* como sujeto experimental para desarrollar una metodología aplicable a la conservación *ex situ* de esta y posiblemente otras especies de nuestro país.

### **RASGOS CARACTERÍSTICOS DE LA ESPECIE.**

*Tillandsia erubescens* es una epífita cortamente caulescente que forma vistosos agregados, sus hojas son recurvadas algo suculentas, con una gran cantidad de escamas foliares cenicientas que le dan una apariencia gris iridiscente. Ecológicamente forma parte de las tillandsias grises, con tendencia epífita dominante y con un sistema radicular poco desarrollado, pero con un sistema de escamas tricomatosas foliares muy desarrollado (Benzing, 1980). La inflorescencia es generalmente simple con flores polísticas, pétalos verde-amarillentos, son sus brácteas florales más vistosas, durante la floración éstas tienen colores que van desde el verde rosado, hasta

el rojo intenso. La especie sólo se encuentra en México y está distribuida desde Chihuahua hasta Oaxaca, es frecuente en el norte del Estado de México donde un estudio previo determinó que se encuentra asociada principalmente a bosques de encino *Quercus*, aunque también podemos encontrarla como epífita de pinos o como rupícola (Huidobro, 1988). Esta especie florece al menos dos veces al año, una de diciembre a enero pudiendo encontrar las cápsulas con semillas madura entre abril y mayo, la segunda floración ocurre entre abril a mayo produciendo semillas en agosto y septiembre. La especie presenta reproducción sexual cruzada, y de sus polinizadores no hay registros, fuera de su ambiente natural no ha sido fácil obtener cápsulas con semillas viables (Huidobro, obs. pers).

Existen tres variedades de la especie: *T. erubescens* var. *arroyoensis*, reportada para el estado de Nuevo León; *T. erubescens* var. *erubescens* distribuida desde Chihuahua hasta Oaxaca y *T. erubescens* var. *patentibracteata*, distribuida en Sinaloa y Durango (Weber, 1983), (Figs. 21y 22 a yb). La especie en estudio presenta una amplia distribución dentro de nuestro país y es un organismo muy adaptable a la altitud y clima de la ciudad de México. Con pocas exigencias en su cultivo, se ha podido mantener disponible para algunas fases del estudio en las instalaciones del Jardín Botánico de la FES-Iztacala, UNAM.

El género *Tillandsia*, como ya fue mencionado, agrupa especies con desarrollo muy lento y semillas que difícilmente prosperan en cultivos convencionales, por lo que el microcultivo *in vitro* ofrece una buena alternativa en la propagación de las mismas.

## **CULTIVO DE TEJIDOS DE BROMELIACEAE**

Existen algunos reportes referentes al cultivo *in vitro* de la familia que nos ocupa entre los que figura el trabajo de Mekers (1977), que realizó un análisis de requerimientos nutricionales en la propagación *in vitro* de algunas especies de Tillandsioideae. Este autor obtuvo buenos resultados en la propagación de *Guzmania lingulata* var. *minor*, *Tillandsia polystachya*, *Vriesea heliconioides*, *Vriesea splendens* y *Vriesea* "Meyer Favoriet". Comparó la eficiencia de los medios sólidos y líquidos con diferentes concentraciones de sales y la influencia de la auxina (ANA) y de giberelina (GA<sub>3</sub>). Realizó pruebas de germinación en diferentes medios de cultivo, agar y papel filtro, concluyendo que uno de los factores más importantes en el éxito cultivo es el control de la salinidad en las primeras etapas de desarrollo.

Hosiki *et al.* (1980), reportó la propagación de algunas Bromeliaceae (*Aechmea*, *Queznelia*, *Guzmania* y *Vriesea*) usando brotes laterales en medio líquido suplementado con 1mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, posteriormente realizó un subcultivo de hojas jóvenes y produjo brotes adventicios los cuales fueron enraizados con 1 mg/l de ANA.

En 1984 Pierik *et al.* realizaron un estudio sobre la influencia de ácido naftalenacético (ANA) en la germinación y subsecuente desarrollo de tres bromeliáceas: *Guzmania minor* var. "Vella", *Guzmania lingulata* var "Splendens" y *Vriesea splendens* var "Fire". La incorporación de ANA en los medios de cultivo estimuló favorablemente el desarrollo general y radicular y se formuló la hipótesis de que el desarrollo lento de las plantas de *Tillandsia* a partir de semillas se debe a una

deficiencia de auxinas.

Roger (1984) Propuso la micropropagación como vía de conservación de *Tillandsia dyeriana*, especie endémica del oeste de Ecuador. Esta especie no ha podido ser cultivada de manera extensiva, ya que a partir de semilla presenta un desarrollo muy lento y la multiplicación vegetativa es limitada. En este trabajo se propagó a partir de semillas de cápsula madura cerrada, con la finalidad de tener condiciones asépticas adecuadas y de mantener condiciones de variabilidad genética natural en la población en estudio, aunque no se reportaron índices de germinación, supervivencia o algún otro parámetro. El autor sugirió como buena la metodología propuesta, aunque no mostró un análisis claro de sus resultados.

Labus-Schneirder y Abel. (1991) propusieron la propagación *in vitro* como una alternativa en la conservación de especies silvestres del género, realizaron la micropropagación de *Tillandsia* sp., a través de embriones inmaduros. En la primera etapa, la salinidad jugó un papel muy importante en la supervivencia, por lo que el medio MS tuvo que ser ajustado para usarse a la mitad de la concentración de sus sales minerales. Asimismo probó varios reguladores como auxinas (ANA, AIA) y citocininas (BAP, KIN) y usó agua de coco en la primera etapa de la germinación. Para la multiplicación fue necesario el control de concentración de sales, también utilizó medio MS con concentración de un tercio de las sales y KC a un medio de su concentración original. Para el crecimiento apical usó MS a la mitad de la concentración de sales y KC con el fitoregulador AIA. No indicó la especie de *Tillandsia* con la que trabajó ni las concentraciones

hormonales para las diferentes etapas de desarrollo.

Pierik y Sprenkel. (1991) describieron un método eficiente de propagación clonal en híbridos seleccionados de *Tillandsia cyanea* a partir de brotes apicales, con la finalidad de conservar características de híbridos seleccionados y poder producir gran número de plantas con características deseadas. Esta especie es cultivada en Holanda a través de semillas, resultantes de polinización cruzada, por lo tanto la población es genéticamente heterogénea y presenta variaciones en el color, tamaño, etc. Por medio de germinación de semillas se producen anualmente medio millón de plantas de la especie. Estos autores usaron medios sólidos y probaron el efecto de ANA y BAP en diferentes concentraciones, la multiplicación se logró en medio sólido con 0.8 mg/l de ANA.

Zirimburegama y Wijesinghe. (1992) desarrollaron el cultivo de brotes apicales de *Ananas comosus* usando medio MS sólido y diferentes reguladores (ANA, AIA y BAP) variando la combinación de los mismos y sus concentraciones.

Ellos observaron que la presencia de primordios de hojas inhibían la proliferación de brotes y lograron la regeneración total de las plántulas en 6 semanas con la adición de ANA  $10^{-7}$  M.

Varadarajan *et al.* (1993) Cultivaron los explantes apicales de la especie de *Puya tuberosa* empleando medios sólidos, vitaminas y reguladores de crecimiento (ANA y BAP). Los explantes fueron extraídos de plantas germinadas por semilla 18 meses antes. Propiciaron la multiplicación de brotes y la multiplicación de callos embriogénicos y no embriogénicos.

Zimmer *et al.* (1993) reportaron la propagación *in vitro* de Tillandsias epífitas. El trabajo se inició con semillas de varias especies de este género, con diferentes tendencias ecológicas: las grises, entre las que se agrupan especies con gran cantidad de escamas tricomas y que habitan ambientes con baja humedad ambiental y las tillandsias de tanque, que con las vainas de sus hojas generalmente imbricadas forma reservorios de agua. La germinación fue estudiada en medios con y sin reguladores de crecimiento y el cultivo se realizó bajo diferentes temperaturas. Los autores concluyeron que la germinación no fue influenciada por temperatura u hormonas de los medios. Las especies en este trabajo fueron *T. capillaris*, *T. cacticola*, *T. croata*, *T. myosura*, *T. pusilla*, y por otro lado *T. butzii*, *T. stricta* y *T. tectorum*. La mayor parte de estas especies son habitantes de Sudamérica; *T. butzii* se encuentra distribuida desde Veracruz hasta Chiapas en México, pero además tiene una amplia distribución en Centroamérica y Sudamérica. Zimmer *et al.*, 1993 citan a Zimmer *et al.* (1976) y en esa investigación anterior, hablaron de los problemas de la propagación *in vitro* de las bromeliáceas.

Bessler (1994) hizo pruebas con la citocinina (BAP) en la propagación vegetativa de algunas especies de *Tillandsia* por inmersión total y por rocío en las hojas de las plantas, indicando buenos resultados en la multiplicación vegetativa, pero no muestra datos numéricos.

Mercier y Kerbavy. (1994) reportaron el cultivo *in vitro* de *Vriesea hieroglyphica*, una especie en riesgo ecológico. La propagación fue a partir de semilla empleando reguladores de crecimiento para inducir

la formación de brotes laterales.

Kiss *et al.* (1995) desarrollaron un método rápido para la micropropagación de Piña, *Ananas comosus*, con el regulador ANA induciendo etiolamiento y la regeneración posterior con los reguladores KIN y BAP, a través de la producción de brotes en los nodos de los crecimientos alargados de plántulas etioladas. Por este método ellos pueden producir cientos de plántulas con características homogéneas.

Bessler (1997) propuso el uso de BAP en la multiplicación de *Tillandsia*, usando concentraciones altas de este regulador de crecimiento en periodos de dos semanas, aunque no muestra resultados numéricos.

Dolgov *et al.* (1998) analizaron la regeneración *in vitro* a partir de explantes de hoja de *Ananas comosus*, formando primeramente callos con reguladores 2iP, KIN, ANA, e IBA combinados en diferentes concentraciones y después la formación de plántulas a partir de callo.

Mayak y Tirosh. (1998), realizaron un análisis del desarrollo *in vitro* de plántulas de *Ananas comosus* con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> y sacarosa, variando la iluminación.

Sidney (2000) realizó la propagación vegetativa en algunas especies de Bromeliaceae a través de cultivo *in vitro* usando diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento (ANA, BAP, KIN, AIA).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

Proponer una metodología de propagación *in vitro* de *Tillandsia erubescens* var. *erubescens* Schltdl. (Bromeliaceae) con fines de conservación *ex situ*.

### **Objetivos particulares.**

Efectuar la micropropagación de *T. erubescens* a partir de semilla.

Determinar la viabilidad de las semillas de *T. erubescens* directa e indirectamente a través de la germinación y la prueba de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC), respectivamente.

Evaluar los requerimientos de sacarosa en la propagación a partir de semillas y la influencia de la misma en el desarrollo de las plántulas.

Efectuar la micropropagación de *T. erubescens* a partir de ápices de tallo.

Determinar los tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento capaces de permitir el desarrollo, la multiplicación y enraizamiento óptimos de *T. erubescens* a partir de ápices de tallo de plantas adultas.

## METODOLOGÍA

### GERMINACIÓN *IN VITRO* DE SEMILLAS

Se colectaron alrededor de 40 cápsulas maduras de plantas de *T. erubescens* en su ambiente natural, preferentemente cerradas, aunque también se colectaron algunas recientemente abiertas, se registró el tamaño y color de la cápsula, generalmente el tono pardo amarillento es un indicador de madurez. Se eligieron especímenes de una comunidad al Norte del Estado de México, en el municipio de Acambay, que correspondieron a *T. erubescens* var *erubescens*. Se escogió este lugar debido a que en él se localizó una población con abundantes individuos de esta epífita y a la posibilidad de encontrar suficientes cápsulas.

Antes de la siembra se aplicó el siguiente tratamiento: eliminación del indumento piloso que cubre la semilla, limpieza con jabón líquido comercial por 15 minutos, desinfección con etanol al 70% por un minuto seguida con hipoclorito de sodio al 20% v/v por 30 minutos y finalizando con dos o tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

La siembra se efectuó en el medio Knudson C (K- 4128 Sigma), pH 5.8 – 6, solidificado con 6g de agar. Se usó la concentración normal de macro y micro nutrientes, sin reguladores de crecimiento, se usaron varias concentraciones de sacarosa, dando a cada medio las siglas correspondientes de identificación (Tabla.1)

Tabla 1. Diferentes concentraciones de sacarosa adicionadas al medio Knudson C ( K – 4128 Sigma).

Tratamientos	K0	K3	K6	K15	K20
Concentración de sacarosa	0%	0.30%	0.60%	1.50%	2.00%

El medio de cultivo fue preparado en el laboratorio según la fórmula de SIGMA a partir de soluciones independientes de macronutrientes y micronutrientes, a fin de poder realizar modificaciones salinas pertinentes en algún momento. El medio de cultivo fue elegido con base en resultados de pruebas preliminares en las que el uso de medios con mayor concentración salina oxidó todos los brotes obtenidos y también con base en la revisión de antecedentes. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de  $22^{\circ} \text{C} \pm 2$ .

La prueba de germinación directa se realizó con semillas de colecta reciente, para asegurar que su edad y condiciones de mantenimiento fueran las mismas. Este lote fue sometido a germinación mensual a lo largo de nueve meses, usándose grupos de 100 semillas con tres repeticiones y se compararon los resultados con los de la prueba de viabilidad del cloruro de trifenil tetrazolio (TTC), propuesta por Van Waes y Debergh. (1986). En esta prueba de germinación se usó medio Knudson C (K-4128 Sigma), con 2% de sacarosa, sólido y sin reguladores. Se consideró que el inicio de la germinación correspondió al tiempo de rompimiento de la cubierta seminal y se determinó el número de semillas en las que se observó dicha respuesta.

Se realizó una segunda prueba para evaluar supervivencia y se consideró como criterio de desarrollo el número de plántulas por tratamiento, el peso de las mismas y la emergencia de la radícula. El medio de cultivo utilizado fue Knudson C (K-4128 Sigma) adicionado con diferentes concentraciones de sacarosa y se determinó la

influencia de la sacarosa en la germinación. También se tomaron datos de supervivencia de las plántulas a partir de la semana 12. Las plántulas fueron pesadas (peso húmedo) periódicamente (12, 16, 20 y 25 semanas) con el fin de comparar la influencia de sacarosa y los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza con una  $p < 0.05$ . Además del peso y número de plántulas en cada medio se consideró el número de plántulas que sin reguladores externos formaron raíces. Por último se cuantificó el enraizamiento sin reguladores que mostraron las plántulas en las diferentes concentraciones de sacarosa a lo largo de 12, 16, 20 y 24 semanas y los resultados fueron sometidos al análisis estadístico de varianza.

Las plántulas que no formaron raíz de manera espontánea en los tratamientos con sacarosa fueron subcultivadas *in vitro* con el regulador de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg /l y con tres repeticiones por tratamiento hasta obtener respuesta.

Se realizaron mediciones posteriores a la germinación como la determinación de clorofila y sacarosa en el tejido de las plántulas y se hicieron cortes histológicos en la parte media de la lámina de la hoja de plántulas de 12 semanas de desarrollo para analizar las secciones diferencialmente con relación a la influencia de la sacarosa, así como la detección del almacenamiento de los carbohidratos de reserva.

## **MÉTODO DE MEDICIÓN DE CLOROFILA EN TEJIDO INTACTO**

Técnica de Hipking (1986).

Se realizaron mediciones periódicas del contenido de clorofila a,b y total para relacionar su contenido con el estado general de la plántulas y la influencia de la sacarosa en la concentración de la misma, iniciándose las mediciones en la semana 12 después de la siembra de la semilla, y repitiéndose en las semanas 16, 20 y 24.

La técnica fue modificada con base en la disposición de tejido para cada prueba. Se usaron 100 mg de tejido fresco y se hicieron tres repeticiones.

La extracción se hizo con 3 ml de acetona al 80 % v/v en mortero frío en baño de hielo; después se centrifugó la muestra a 5000 rpm durante 5 minutos; se separó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 5000 rpm por otros 5 minutos; se unieron los sobrenadantes y se realizó su lectura en el espectrofotómetro (Perkin - Elmer Lambda 2 uv/ vis Spectromer) a 645 nm, 652 nm, y 663 nm de absorbancia para determinar las clorofilas a, b y t respectivamente. La cantidad de clorofila fue calculada con las ecuaciones siguientes:

$$\text{Clorofila a} = 12.7(A_{663}) - 2.69 (A_{645})$$

$$\text{Clorofila b} = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663})$$

$$\text{Clorofila t} = 20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})$$

En estas ecuaciones las lecturas de absorbancia en diferentes longitudes de onda son multiplicadas por valores constantes predeterminados.

## **MEDICIÓN DE SACAROSA A TRAVÉS DEL MÉTODO DE ANTRONA:** Pollard *et al.* ( 1990) Modificado

Para la determinación de sacarosa en el tejido se utilizó el reactivo de antrona el cual, se preparó de la siguiente manera:

37.5 mg de antrona

19 ml de ácido sulfúrico concentrado

7.5 ml de agua destilada.

Después de algunas pruebas, se estandarizó la metodología y se utilizaron solamente 10 mg de tejido fresco para poder registrar lectura en el espectrofotómetro. El tejido fue molido en mortero frío con nitrógeno líquido y el polvo resultante centrifugado con 3ml de Buffer - Fosfato a 10000 rpm durante 8 minutos.

La solución de buffer fosfato fue preparada en la siguiente forma:

7.8 g  $\text{Na H}_2\text{PO}_4$  fosfato de sodio monobásico

38.6 g  $\text{Na}_2\text{H PO}_4$  fosfato de sodio dibásico.

1000 ml agua destilada

A pH 7.1

Se incubaron las muestras a 100 °C por 10 min, después se enfriaron a temperatura ambiente. Se tomaron 300 microlitros de la muestra y se hicieron reaccionar con 4ml de la solución de antrona durante 40 minutos a 40 °C, protegidos de la luz; se dejaron enfriar y se midió a 620 nm de absorbancia en el espectrofotómetro (Perkin- Elmer Lambda 2 uv/vis Spectromer).

## **CORTES HISTOLÓGICOS**

Se hicieron cortes histológicos de plántulas germinadas *in vitro* con 12 semanas de desarrollo y de callos del cultivo de ápices de tallo de plántulas del campo, en la forma que a continuación se describe.

### **CORTES DE HOJAS DE PLANTAS IN VITRO**

Se realizaron cortes de la lámina foliar de plántulas derivadas de germinación *in vitro* de semilla cultivadas bajo 5 diferentes concentraciones de sacarosa y también de plantas silvestres de 4 cm (PC) y plantas silvestres en floración de 20 cm (PF), con el fin de comparar los tejidos. Se utilizó una técnica manual, usando una navaja Gillette ultra delgada, los cortes se realizaron bajo el microscopio estereoscópico (Carl Zeiss) a 1x y 4x. Los cortes se realizaron en la parte media de la lámina y fueron en forma transversal.

Algunas secciones fueron tratadas con lugol únicamente. Otras fueron lavadas con alcohol absoluto en ebullición para eliminar el exceso de clorofila y posteriormente tratados con lugol, otros fueron teñidos con Sudan III. Después de la tinción fueron montados en gelatina transparente, observados y fotografiados en el microscopio óptico Nikon de contraste de fases empleando los objetivos 4X, 10x y 40x para su posterior análisis.

Se tomaron medidas del diámetro de las células del mesofilo central encima y por debajo del parénquima clorofílico, del grosor del parénquima clorofílico, grosor de la lámina también se contaron el número de estratos formados por las células del mesofilo. Estas

mediciones fueron hechas en el microscopio óptico y con reglilla micrométrica ambos Carl Zeiss.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza con  $p < 0.05$  y una prueba de Tukey con el fin de detectar diferencias estadísticas claras sobre la influencia organogénica de la sacarosa en el cultivo *in vitro*.

Los cortes y las tinciones se realizaron con base en los manuales de Microtecnia Vegetal de Curtis (1986) y Roth (1964).

#### CORTES DE CALLO DERIVADO DE CULTIVO DE APICES DE TALLO.

Los cortes de callos se realizaron con la Técnica de EPON- 802 en el Laboratorio de Histología de la Unidad de Morfofisiología de la FES Iztacala. Para ello se fijó el material con 2ml de glutaraldehído, durante 24 hrs en refrigeración. Se enjuagó con buffer de colidina con sacarosa (0.12M) diluida en agua destilada 1:1 por 35 min, con cambios de buffer de fosfato (pH7) cada 5 min. Posteriormente en la campana de extracción el material fue fijado en tetraóxido de osmio ( $Os O_4$ ) durante 30 min. Se procedió a deshidratar en una serie ascendente de alcoholes (30%, 50%, 70%, 80%, 96%), realizando el cambio de cada uno cada 15 minutos, además con alcohol absoluto se realizaron tres cambios cada 15 minutos. Se efectuó la preinfiltración en óxido de propileno con dos cambios cada 15 minutos, posteriormente se incluyeron en una mezcla de óxido de propileno/EPON 812 1:1 durante 24 horas a temperatura ambiente, en un recipiente hermético. Se destapó el recipiente bajo una campana de extracción para evaporar el óxido de propileno. Las muestras se infiltraron con resina EPON - 812 pura sin catalizador

por un periodo de 24 horas. El material incluido en resinas se cortó en un ultramicrotomo Leka ultracut R.

### **CULTIVO *IN VITRO* DE APICES DE TALLO.**

Los ápices de tallo fueron extraídos de plantas colectadas en el campo. El material fue colectado en el Parque " El Oso Bueno" en el Municipio de Acambay al Norte del Estado de México, en un bosque de encinos a 2,400 m de altitud.

Las plantas colectadas en el campo fueron seleccionadas por presentar características especiales y distintivas dentro de la especie, como la coloración de sus brácteas florales, prefiriéndose los colores más intensos, mayor tamaño y vigor del organismo así como aquellas plantas que presentaron mayor número de brotes laterales. Las plantas colectadas fueron mantenidas en el Jardín Botánico exterior de la FES-Iztacala hasta su utilización.

Para realizar la extracción e inoculación de los ápices de tallo se siguió el siguiente procedimiento: homogenización de la muestra para incluir organismos con tallas de tres a cuatro centímetros.

Corte de las hojas eliminando la mayor parte de la lámina y dejando adherida la vaina para facilitar el trabajo de aproximación a los crecimientos apicales.

Lavado de los crecimientos apicales con jabón para iniciar la desinfección y enjuague con agua corriente.

Una desinfección con etanol al 80% v/v por un minuto y después otra con solución de hipoclorito de sodio al 20% v/v durante 15 minutos; finalmente se efectuó el enjuague con agua destilada esterilizada, 3

veces.

Se separaron las vainas de las hojas y se dejaron los brotes apicales en hipoclorito de sodio al 1% v/v mientras duró la inoculación y se enjuagaron con agua destilada esterilizada antes de ser inoculados en el medio de cultivo. El medio empleado fue Murashige-Skoog (M-5519 Sigma) preparado en el laboratorio con soluciones de macronutrientes y micronutrientes independientes para emplear únicamente la mitad de la concentración de macrosales. Se usó medio sólido con 0.7% de agar a pH 5.8 – 6 y se adicionó con 3% de sacarosa, la concentración de vitaminas por litro fue modificada para tener 100 mg de mioinositol, 5 mg de tiamina, 5 mg de ácido nicotínico, 0.5 mg de piridoxina, 4 mg de glicina. El medio se ajustó a pH 6 antes de ser esterilizado en autoclave a 121° C y 1.8 Kg/m<sup>2</sup> de presión, durante 15 minutos. Finalmente, la inoculación se efectuó en la campana de flujo laminar.

Para el microcultivo de ápices se usaron ocho combinaciones de ácido naftalenacético, ANA (0.01, 0.1 mg/l) y bencil-aminopurina BAP (0.5, 1, 1.5, 2 mg/l) correspondiendo a cada concentración de BAP una de dos posibles concentraciones de ANA resultando 8 combinaciones, (Tabla 2) y se hicieron 5 repeticiones por cada tratamiento hormonal. Para establecer cuál de las combinaciones usadas generaría mejores resultados de acuerdo a los objetivos, se realizaron subcultivos cada 4 semanas para evitar que el empobrecimiento del medio afectara el desarrollo de los organismos

Tabla 2. Tratamientos basados en la combinación de reguladores de crecimiento para el cultivo de meristemas.

BAP (mg/l)	0.5	1.0	1.5	2.0
ANA (mg/l) 0.01	0.5/0.01	1/0.01	1.5/0.01	2/0.01
0.1	0.5/0.1	1/0.1	1.5/0.1	2/0.1

Las condiciones del microcultivo incluyeron un fotoperiodo de 16/8 hrs una radiación (PAR) de  $34 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ , proporcionada por lámparas Phillips ( Mi F40d 40 Watts) de luz blanca fluorescente y temperatura de  $22^\circ\text{C} \pm 2$ .

Dentro de las observaciones se tomaron en cuenta parámetros cualitativos como: apariencia de los crecimientos, ya fueran apicales o laterales; apariencia de los callos, duros o friables; indicios de hiperhidratación u oxidación. En relación con los parámetros cuantitativos se registró el número de brotes laterales, el tamaño en milímetros del crecimiento apical central, y el peso en mg. Con estos resultados se realizó un análisis de varianza para definir diferencias entre cada combinación de reguladores de crecimiento.

## ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS DERIVADAS DE ÁPICES DE TALLO.

Para el enraizamiento de plántulas derivadas de ápices se probaron diferentes tratamientos hormonales.

Tabla 3. Reguladores de enraizamiento empleados en plántulas derivadas de ápices de tallo de *T. erubescens*.

TRATAMIENTOS			
1.- ANA	0.5mg/l	1mg/l	1.5mg/l
2.- ANIA*	0.5mg/l	1mg/l	1.5mg/l
3.- IBA	0.5mg/l	1mg/l	1.5mg/l

Cada uno de los tratamientos fue probado en tres concentraciones del regulador y para cada una se hicieron tres repeticiones, se usó medio Murashige-Skoog (M-5519 Sigma) solidificado con 7 g/l de agar. El medio fue preparado con la mitad de las macrosales, 3% de sacarosa y se le adicionó uno de los reguladores en las diferentes concentraciones propuestas, la iluminación, el pH y la temperatura se mantuvieron con los mismos valores ya descritos.

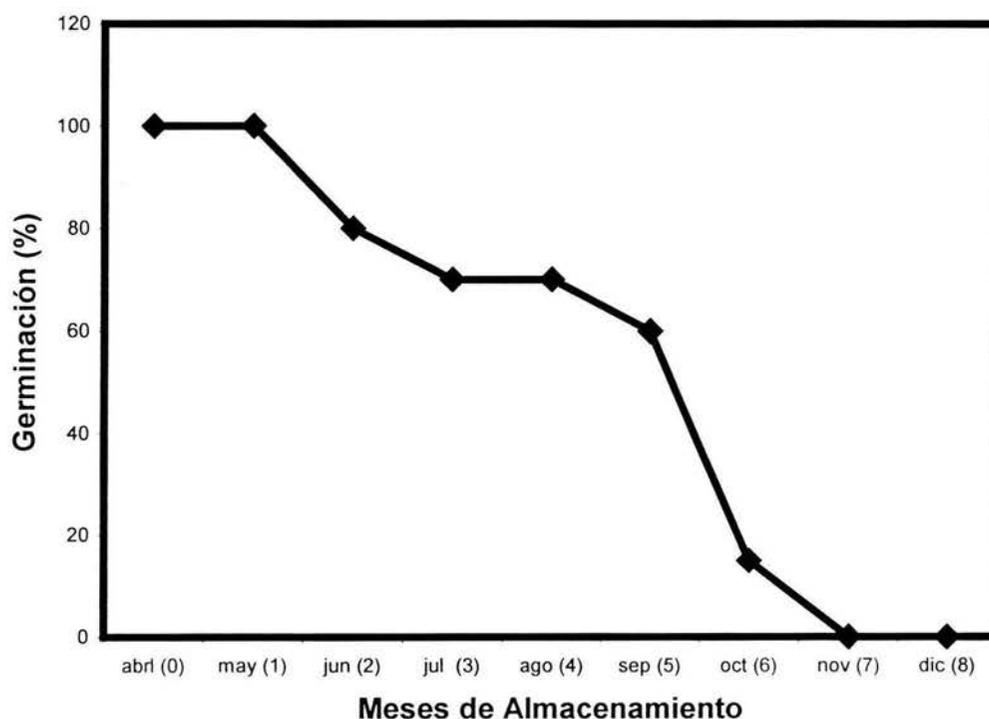
Para el análisis de resultados se consideraron el tiempo de aparición de raíces, la apariencia de la planta y la ocurrencia de oxidación.

\* ANIA es un regulador patentado por el grupo de investigación del laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO en la FES-Iztacala UNAM.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### GERMINACIÓN

Se comparó la germinación directa de un lote de semillas de reciente maduración con la evidencia de viabilidad aportada por el cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). Con la prueba de TTC se observó coloración roja positiva en los embriones que denotó viabilidad durante todo el tiempo que el lote fue germinado en el medio de cultivo Knudson C (durante 9 meses) e incluso después de un año (Fig. 23 A). Sin embargo, la germinación directa no igualó los datos de viabilidad obtenidos con la prueba de tetrazolio. En la Fig. 1 se puede observar cómo decae paulatinamente el porcentaje de germinación, siendo muy bajo a partir del séptimo mes y nulo en el octavo.



**Fig. 1. Germinación de semilla fresca de *T. erubescens*, evaluada periódicamente a lo largo de 9 meses.**

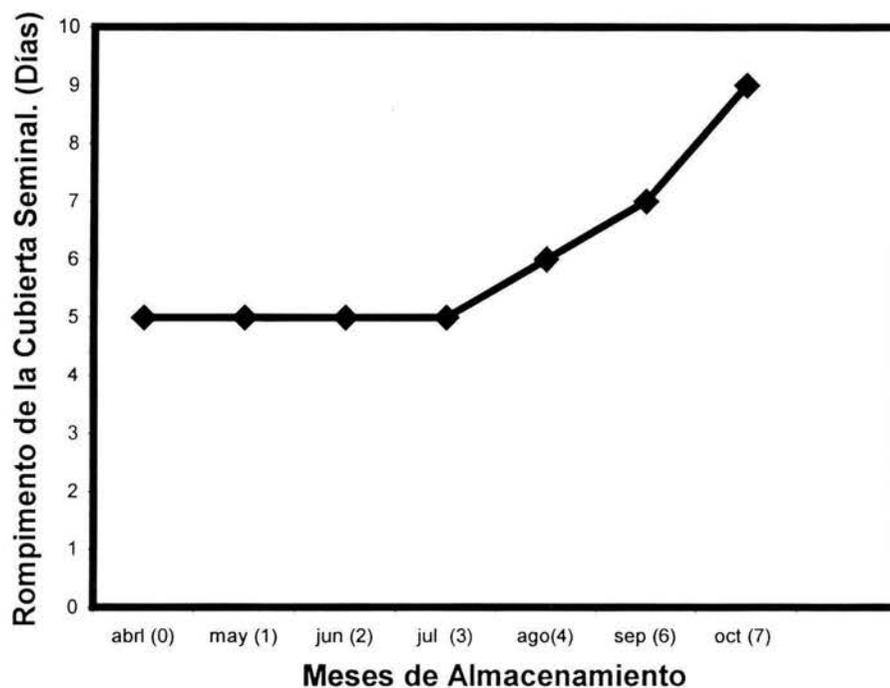
Las semillas fueron conservadas en lugar seco, a temperatura estable de 20° C, en bolsas de papel de estrasa, en estas condiciones de almacenamiento, las posibilidades de germinación para la especie no rebasaron los siete meses de acuerdo con las condiciones establecidas en este estudio. Una compensación a esta baja longevidad de la semilla es probablemente la estrategia de producción de las mismas en la especie, que, produce frutos dos veces al año y cápsulas conteniendo un promedio de 250 semillas, cabe mencionar que esta especie tiene una estrategia reproductiva privilegiada dentro del género donde la mayoría de las especies solamente florecen una vez al año y las cápsulas producen entre 50 y 100 semillas.

Se consideró como criterio de germinación el rompimiento de la cubierta seminal y la emergencia de la plántula (Fig. 23 B). Durante los dos primeros meses después de la colecta hubo un porcentaje de 100% y posteriormente hubo un descenso paulatino, llegando a ser nula después de ocho meses de germinación periódica (Fig. 1).

En la Fig. 2 se puede observar que el rompimiento de la cubierta seminal y la emergencia de la plántula se inició alrededor del 4° ó 5° día mientras la semilla fue de maduración reciente, pero después de un cierto tiempo de almacenamiento (4 meses, Fig. 2), el rompimiento de la cubierta seminal se retrasó hasta nueve días; por lo que el número de días necesarios para lograr el rompimiento de la cubierta fue aumentando. Las plántulas completas pudieron observarse después de tres semanas de cultivo y la aparición de la radícula ocurrió en promedio en la semana 12.

Zimmer *et al.* (1993) realizaron un estudio sobre la propagación en condiciones *in vitro* de algunas especies de *Tillandsia* a partir de semilla y mencionan que el tiempo estimado en la germinación total de algunas especies de *Tillandsia* como *T. cacticola*, *T. capillaris*, *T. croata* y *T. myosura*, fue de doce semanas y para *T. butzii*, *T.*

*stricta*, *T. tectorum* fue de 24 semanas, estos investigadores consideraron como germinación, la emergencia de la plántula y de la radícula. Para evaluar la germinación consideraron variaciones de temperatura y medios con diferentes concentraciones de reguladores, ANA y BAP, no hicieron repeticiones de tratamientos y evaluación estadística y tampoco mencionan la edad de semillas, finalmente concluyen que la temperatura y los medios no tienen mucha influencia en la germinación y que al quitar la citocinina se acelera el desarrollo de las plántulas y que la masa fresca aumenta rápidamente en cultivo *in vitro* en comparación con los cultivos tradicionales.



**Fig. 2. Tiempo de rompimiento de la cubierta seminal de la semilla de *T. erubescens*, evaluadas periódicamente a lo largo de 9 meses.**

Probablemente las condiciones de humedad elevada y la composición química del medio, en el cultivo *in vitro* provocaron

que algunas semillas desarrollaran formaciones amorfas y translúcidas que en algunos casos dieron lugar a verdaderos callos, aunque en la mayoría de los casos, éstas murieron por oxidación (Fig. 24 A y B), otras al ser puestos en medio con 0.5mg/l de BAP se desarrollaron formando masas de callo blando y éstas al ser mantenidas en condiciones de poca humedad generaron plántulas normales (Fig.35 A y B).

Las pruebas de viabilidad, (TTC) y germinación no se correlacionaron por lo que puede considerarse que son necesarios más estudios sobre la viabilidad de la semilla, así como otros métodos para inducir la germinación de la misma. También podrían ser tomadas en cuenta otras formas de conservación que prolongaran la longevidad de la semilla, como los procedimientos de reducción del contenido de humedad y la refrigeración a temperatura de 4 o 5° C.

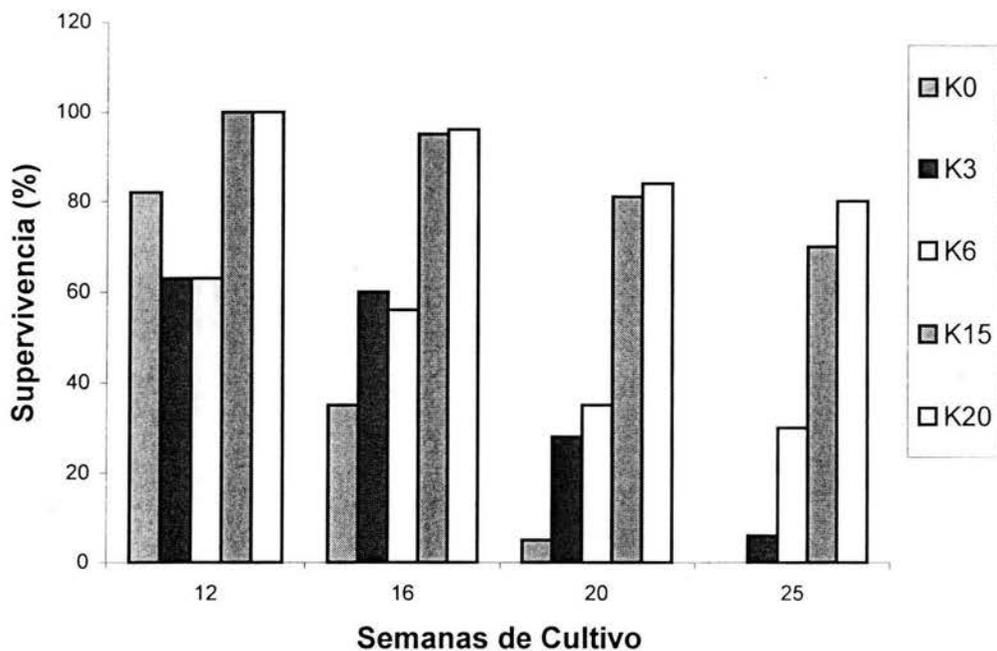
## SUPERVIVENCIA

Empleando diferentes concentraciones de sacarosa (Tabla 1), se pudo observar que a las 12 semanas de cultivo, la supervivencia de las plántulas no mostró diferencias estadísticas significativas con una  $p < 0.05$ , por lo que la sacarosa pareció no influir en esta primera etapa de desarrollo; incluso, se observó que las plántulas sin sacarosa tuvieron un mejor desarrollo que las de los tratamientos con 0.3% y 0.6% de sacarosa y que la supervivencia sin sacarosa fue cercana a la de los tratamientos que la tuvieron en proporciones de 1.5% y 2% (Fig. 3).

Después de estas primeras 12 semanas de cultivo se observó la emergencia radicular mencionada por Zimmer *et al.* (1993), la cual sí fue influida por la concentración de sacarosa.

A las 20 semanas de cultivo en el tratamiento con 0% de sacarosa (K0) sólo sobrevivieron 5.2% de plántulas de un 82% observado en

las 12 semanas; en tanto, los tratamientos K15 y K20 permitieron una mayor supervivencia de las plántulas, por lo que puede considerarse que el periodo de 20 semanas fue suficiente para demostrar que la sacarosa influyó directamente en la supervivencia, manteniendo vivas a más del 80% de éstas, además su apariencia externa fue más vigorosa (Figs. 3 y 24). En la semana 25 se hizo más evidente la influencia de la sacarosa y solamente los tratamientos con 1.5 y 2 % de sacarosa permitieron un mejor desarrollo de las plántulas.



**Fig. 3. Supervivencia de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0 0%, K3 0.3%, K6 0.6%, K15 1.5% y K20 2%).**

Por los resultados obtenidos puede sugerirse que la sacarosa de los tratamientos durante las primeras 12 semanas de cultivo, no influyó directamente el desarrollo de las plántulas y, si consideráramos las apreciaciones de Zimmer *et al.* (1993) que evaluaron la germinación total sólo después de la emergencia radicular (12 semanas), el

porcentaje de germinación tampoco se vería influenciado por el azúcar exógeno, más bien éste evento estaría relacionado con factores intrínsecos de la semilla referidos a reservas metabólicas o tiempo de cosecha. También se observó que otros factores externos como son la concentración de sales minerales del medio afectaron directamente la germinación. En este trabajo el medio MS probado inicialmente para la germinación pero fue sustituido por el medio KC el cual contiene menor concentración de sales. Estos hallazgos difieren de las observaciones de Mekers (1977) quien concluyó que los medios con concentraciones elevadas de sacarosa son mejores para la germinación de *Tillandsia*.

Por otra parte, el éxito del cultivo después de las 12 primeras semanas se vió influenciado directamente por la concentración de sacarosa en los medios, lo que corrobora la necesidad del aporte de carbohidratos en ciertas fases del cultivo *in vitro*, de aquí que las concentraciones de sacarosa adecuadas para el buen del cultivo de la especie no deben ser inferiores al 1.5%.

Los tratamientos con 1.5% y 2% de sacarosa ofrecieron un mejor sostén y garantizaron la supervivencia para las plántulas, las cuales tuvieron más vigor y buena apariencia externa.

## PESO FRESCO DE PLÁNTULAS CULTIVADAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SACAROSA.

El peso de las plántulas cultivadas en el medio KC con diferentes concentraciones de sacarosa a las 12 semanas de cultivo fue sometido a un análisis de varianza para variables independientes y éste no evidenció una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). El tratamiento K3 mostró cierta variación en los resultados, la cual probablemente pareció estar más relacionada con características internas de la semilla que con la influencia del medio, ya que aquí se

encontraron plántulas con peso muy bajo al mismo tiempo que otras con un excelente desarrollo, este dato se deja manifiesto en la desviación estándar de dicho tratamiento, ver negritas, (Tabla 4; Fig. 4).

**Tabla 4. Media y una desviación estándar del peso fresco (mg) de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (con negritas se muestran medias significativas).**

TRATAMIENTO	K3	K6	K15	K20
TIEMPO DE CULTIVO	— $\bar{X} \pm S$	— $\bar{X} \pm S$	— $\bar{X} \pm S$	— $\bar{X} \pm S$
12Semanas	26.9 $\pm$ <b>22</b>	24.9 $\pm$ 19	26.7 $\pm$ 8.49	22.6 $\pm$ 8.61
16Semanas	45.7 $\pm$ 29.2	56.5 $\pm$ 29.18	54 $\pm$ 29.11	<b>86 <math>\pm</math> 35.75</b>
20Semanas	58.1 $\pm$ 29.5	<b>91,6 <math>\pm</math> 36.2</b>	61.1 $\pm$ 17	<b>91.1 <math>\pm</math> 36.4</b>
25Semanas	80 $\pm$ 26.2	124 $\pm$ 28.12	138 $\pm$ 29.1	<b>157 <math>\pm</math> 29.25</b>

En la semana 12 se pudo observar que el peso fresco de las plántulas de los diferentes tratamientos no mostró una diferencia estadística significativa que nos indicara cual de los tratamientos beneficiaba más al cultivo. Durante la semana 16 se pudo observar que el tratamiento K20 mostró un aumento significativo de peso fresco. En la semana 20 los tratamientos K6 y K20 parecen mostrar el mismo efecto, pero existen diferencias cualitativas evidentes que indicaron un mejor desarrollo de las plántulas del tratamiento K20 como son: tamaño, color, consistencia firme de los tejidos etc. y signos de hiperhidratación en el tratamiento K6, tejidos translucidos, turgentes e hinchamiento general de las plántulas. Para la semana 25 el número de plántulas supervivientes en los tratamientos K3 y K6 fue muy limitado, esto aunado a la utilización de algunas plántulas para cuantificar clorofila y sacarosa en tejido impidió seguir las mediciones. En esta semana se pudo observar que la diferencia de

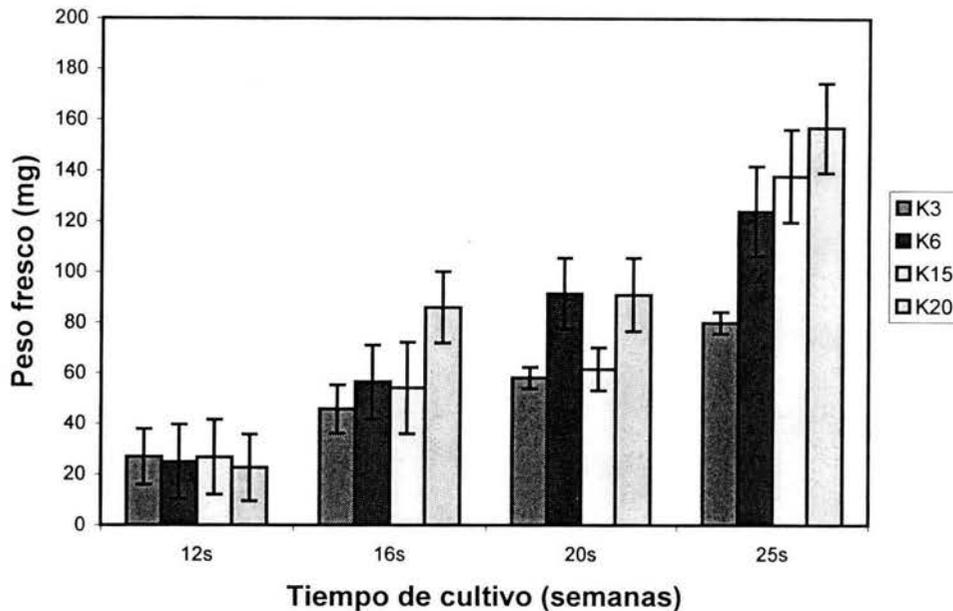
peso en cada tratamiento se hizo cada vez más notable y que entre un tratamiento K3 y el K20 esta diferencia se duplicó (Fig. 4).

En los periodos de medición de las semanas 16, 20 y 25, se pudo observar que el tratamiento K20, con mayor concentración de sacarosa, provocó en las plantas una tendencia a aumentar continuamente de peso a través del tiempo de cultivo (Fig. 4). El tratamiento K3 con una concentración mínima de sacarosa (0.3%) no causó aumento en el peso fresco del cultivo, lo cual se tradujo en crecimiento nulo y mortandad de un número importante de plántulas. El tratamiento K6 causó aumento en el peso de las plántulas, aunque éste estuvo asociado a síntomas de hiperhidratación, conforme a la descripción hecha por Pàques (1991). El tratamiento K15 condujo a una respuesta caracterizada por incremento de peso fresco un tanto irregular aunque en general ascendente.

Debe considerarse que el peso fue calculado a partir de tejido fresco y que éste estuvo influenciado por la acumulación de agua (Fig. 4).

El análisis histológico de las láminas de las hojas de las plántulas indicó que las plantas provenientes de tratamientos con concentraciones bajas de sacarosa mostraron turgencia celular y variación en el parénquima del mesófilo, en cuanto a número de estratos y tamaño celular, por lo que el peso de las plántulas cultivadas en los tratamientos K3 y K6 está modificado por los efectos de la sobrehidratación y los síntomas de la misma son evidentes. (Fig. 28 A y B).

La diferencia en el peso fresco de las plántulas mostró diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) a partir de la semana 16 de cultivo, en la que el peso fresco promedio de plántulas cultivadas con 2% (K20) de sacarosa duplicó el peso de plántulas de tratamientos con 0.3% de sacarosa (Tabla 4).



**Fig. 4. Peso fresco de plántulas de *T. erubescens* derivadas de la germinación y cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K3 0.3%, K6 0.6%, K15 1.5% y K20 2%).**

La media del peso fresco de las plántulas cultivadas en los tratamientos K3 y K6, no reflejó un incremento real, ya que el tejido de estas estaba con hiperhidratación evidente, turgente, translucido y quebradizo se observaron cambios histológicos resultantes de fenómenos fisiológicos relacionados con la baja concentración de sacarosa; por eso, el peso fresco no se consideró un parámetro definitivo para comparar el desarrollo obtenido en cultivo *in vitro*.

La nula ó baja supervivencia de las plántulas desarrolladas en los tratamientos con bajas concentraciones de sacarosa impidieron comparar los pesos de las plántulas después de la semana 25.

Se observó que en el análisis de resultados existió una desviación estándar muy alta para todos los tratamientos lo que nos está indicando el grado de variabilidad de respuesta de la semilla elevado, que esta respuesta parece estar determinada genéticamente por lo que queda fuera de la influencia total de los tratamientos

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LÁMINAS FOLIARES DE PLANTULAS CON 12 SEMANAS DE DESARROLLO.

La hoja de *Tillandsia erubescens* está formada por una vaina de textura membranosa adherida al eje de crecimiento y una lámina que se angosta triangularmente hacia el ápice, las hojas son ligeramente suculentas y están cubiertas por escamas tricomas que le dan una apariencia gris. Al hacer un corte transversal en la parte media de la lámina de una planta silvestre (PC y PF) se pudo observar una epidermis adaxial formada por una capa de células y una epidermis abaxial de las mismas características, entre las epidermis se ubica el mesofilo monofacial el cual es atravesado por una zona de haces vasculares rodeados por el parénquima clorofílico, este forma una banda regular bien definida y asociada a los haces vasculares (Fig. 26)

En las secciones transversales de la parte media de las láminas de plántulas con doce semanas de desarrollo, cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa, se registró y se analizó el diámetro de las células del mesófilo; número de estratos celulares del mesófilo; grosor total de la parte media de la hoja y características del parénquima clorofílico (Figs. 27 y 28).

Se ha determinado que los carbohidratos de los medios de cultivo influyen en los procesos de organogénesis general y otros eventos fisiológicos. Capellades *et al.* (1991), relacionaron la concentración de sacarosa en los medios de cultivo con la capacidad fotosintética de los organismos cultivados; Gulsen *et al.* (1991) propusieron a la sacarosa, como un factor muy importante en la producción de brotes laterales en la micropropagación de membrillo y Van Huylenbroeck *et al.* (1995; 1996) reportaron el impacto de la concentración de sacarosa en los medios, su acumulación como reserva de almidón, su influencia en el enraizamiento y adaptación *ex vitro* de las plántulas en cultivo. Por lo que, los carbohidratos sirven como reserva para

procesos de alto requerimiento de energía y de agentes osmóticos, como es el caso de los azúcares libres solubles (Thorpe, 1986).

Las plántulas que crecieron en medios con diferentes concentraciones de sacarosa mostraron variaciones en su apariencia externa tales como, tamaño de la planta, grosor y color de la hoja, (Figs. 24 y 25 A). Al revisar las secciones histológicas se observó que el mesófilo presentó variaciones en el tamaño de las células, los valores del diámetro de las células mostraron diferencias claras entre los diferentes tratamientos ( $p < 0.05$ ), siendo K3 y K6 los que más incrementaron el tamaño celular (Fig. 28 A y B, Tablas 5 y 6). Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en relación con las concentraciones de sacarosa. Con la prueba de comparación de medias de Tukey (Tablas 5 y 6) se determinó que el tratamiento K6 mostró una mayor variación, con un promedio de  $125.2 \mu\text{m} \pm 12.5$ . Pudo observarse que los tratamientos K3 y K6 causaron aumento en el diámetro celular al disminuir el azúcar libre, debido a que probablemente la regulación osmótica se vió afectada y los azúcares libres no fueron suficientes para detener el hinchamiento celular, como lo mencionó Thorpe (1986). Se observó también un adelgazamiento de las paredes celulares las cuales se rompieron fácilmente al realizar los cortes; al adelgazarse las paredes, la resistencia a la entrada de agua disminuye y por lo tanto la células aumentan en tamaño (Figs. 5 y 28 A). Estas observaciones se apoyaron en las revisiones de Pàques (1987 a; 1991) donde mencionó las causas y los remedios de la hiperhidratación en cultivo *in vitro*

Es necesario mencionar que al hacer manualmente los cortes existe la posibilidad de un gran margen de error en la interpretación de la forma y el tamaño celular pero es evidente que existen diferencias y que es necesario hacer más estudios que nos lleven a corroborar los hallazgos de este trabajo.

**Tabla 5. Diámetro (  $\mu\text{m}$  ) de las células del mesófilo de plántulas cultivadas durante 12 semanas bajo diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15, K20) y plantas silvestres (PC y PF) de *T. erubescens* (con negrita, se muestran las diferencias significativa).**

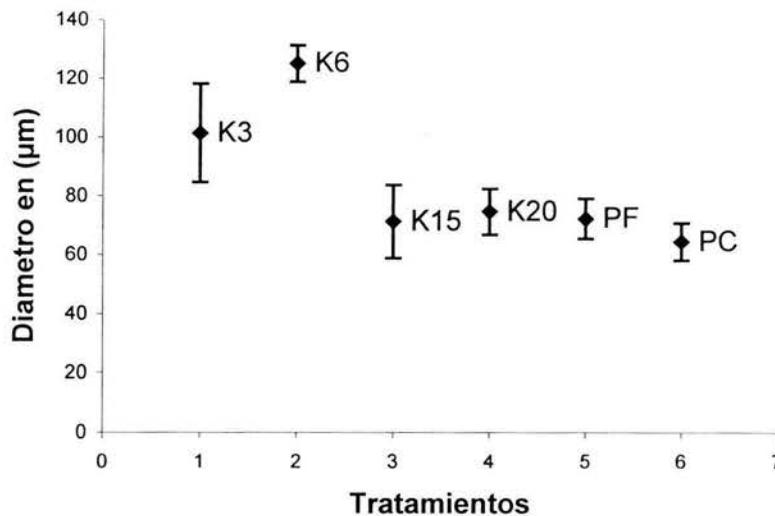
TRATAMIENTOS Y SILVESTRES	$\bar{X} \pm S$
K3	101.31 $\pm$ 33.54
K6	<b>125.17 <math>\pm</math> 12.46</b>
K15	71.24 $\pm$ 24.96
K20	74.66 $\pm$ 15.62
PC	64.5 $\pm$ 12.73
PF	72.33 $\pm$ 13.62



**IZT.**

**Tabla 6. Prueba de Tukey para evaluar diámetros( $\mu$ ) celulares de plántulas *in vitro* de con 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa, (K3, K6, K15 y K20) y plantas silvestres (PC y PF) *T. erubescens*. (con negritas se muestran las diferencias significativas).**

K6	K3	K20	PF	K15	PC		
125.17	101.31	74.6	72.69	71.24	64.6		
	<b>23.8</b>	<b>50.57</b>	<b>52.31</b>	<b>53.93</b>	<b>60.56</b>	125.17	K6
		<b>23.71</b>	<b>28,62</b>	<b>30,07</b>	<b>36,17</b>	101.31	K3
						74.6	K20
						72.69	PF
						71.24	K15
						64.6	PC



**Fig. 5. Media y desviación estándar del diámetro de las células del mesófilo de la hoja de plántulas a las 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20). y plantas silvestres (PC y PF) de *T. erubescens*.**

En relación con número de estratos del mesofilo se consideraron por separado los que están bajo la epidermis (adaxiales) y sobre el parénquima clorofílico y los que están bajo del mismo y sobre la epidermis (abaxiales). Los tratamientos K6, K15 y K20 condujeron a un desarrollo de estratos similar al que presentan las plantas silvestres en floración (PF). con una media de  $7 \pm 0.45$  estratos mientras que el tratamiento K3 sólo indujo a la formación de 3 o 4 estratos (Tabla 7; Figs. 6 y 7). Con respecto al grosor total del mesofilo este no estuvo directamente relacionado con el diámetro de las células ya que en K3 se observan células muy grandes pero el número de estratos en el mesofilo está muy reducido y las hojas son delgadas. En el tratamiento K6, el engrosamiento de la lámina se debió a un aumento en el número de estratos, así como al incremento en el diámetro celular, estas observaciones histológicas donde las células se ven muy grandes señalan signos de

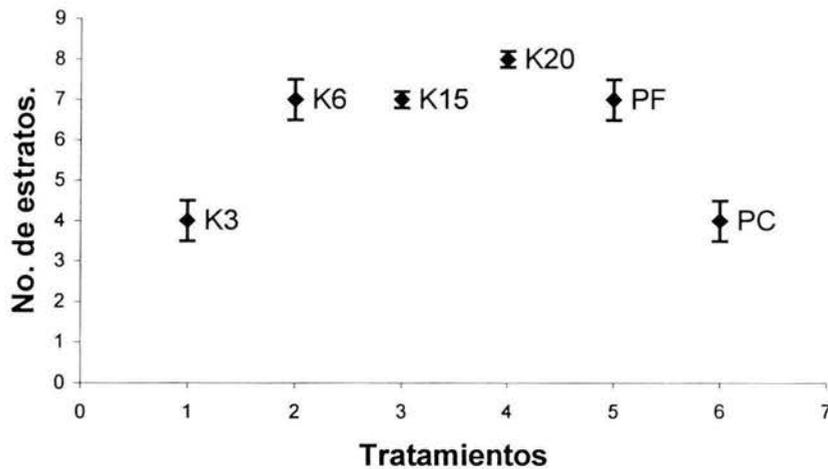
hiperhidratación, que parecen estar influenciados por las bajas concentraciones de sacarosa (Tabla 8 y Fig. 28B).

**Tabla 7. Número de estratos celulares del mesofilo, adaxiales al parénquima clorofílico en plantas silvestres (PC, PF) y plántulas *in vitro* de *T. erubescens* con 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) (con negritas se muestran medias significativas).**

TRATAMIENTOS Y PLANTAS SILVESTRES	X ± S
K3	3.6 ± 0.89
K6	<b>7.0 ± 0.71</b>
K15	<b>7.2 ± 0.45</b>
K20	<b>7.8 ± 0.45</b>
PC	4.4 ± 0.55
PF	6.6 ± 1.14

**Tabla 8. Prueba de Tukey aplicada para evaluar estratos celulares adaxiales de plántulas *in vitro* con 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) y de plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (en negritas se muestran valores significativos).**

TRATAMIENTOS K20	K15	K6	PF	PC	K3		
7.8	7.2	7.0	6.6	4.4	3.6		
			<b>1.2</b>	<b>3.8</b>	<b>4.2</b>	7.8	K20
				<b>3.0</b>	<b>3.6</b>	7.2	K15
				<b>2.6</b>	<b>3.0</b>	7.0	K6
					<b>1.6</b>	6.6	PF
						4.4	PC
						3.6	K3



**Fig. 6. Media y desviación estándar del número de estratos celulares en el mesofilo de lámina de la hoja (adaxiales) al parénquima clorofílico) de plántulas a las 12 semanas de desarrollo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) plantas silvestres (PC y PF) de *T. erubescens***

En los estratos abaxiales al parénquima clorofílico, se observó un desarrollo de más estratos en el tratamiento K20; en este caso incluso mayor al de las plantas del campo, se puede considerar que los tratamientos K6, K15 y K20 son tratamientos con una diferencia significativa y con un mejor desarrollo de estratos (Tablas 9 y 10; Figs. 7, 27 C y D).

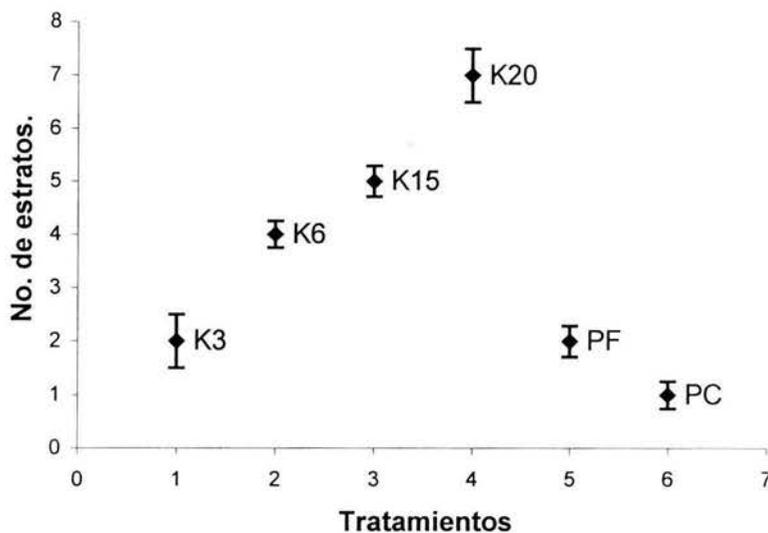
Pàques y Boxus. ( 1987 a, b y c) y Pàques (1991), realizaron una amplia revisión de las causas y soluciones propuestos para la hiperhidratación en la micropropagación, a la que definen como un desorden fisiológico que depende de numerosos factores químicos y físicos que actúan sinérgicamente. Las hojas hiperhidratadas se caracterizan por ser suculentas, translúcidas o bien las hojas se vuelven quebradizas. Particularizando en la investigación

**Tabla 9. Número de estratos celulares en el mesófilo abaxial al parénquima clorofílico de plántulas *in vitro* a las 12 semanas de desarrollo cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa y plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (con negrita, se muestran medias significativas).**

TRATAMIENTOS	X + S
K3	2.0 + 1.16
K6	3.75 + 0.50
K15	4.5 + 0.58
K20	<b>6.5 + 1.0</b>
PF	1.5 + 0.58
PC	1.25 + 0.50

**Tabla 10. Prueba de Tukey aplicada para evaluar estratos celulares abaxiales de plántulas *in vitro* con 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa y plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (con negrita se muestran valores significativos).**

TRATAMIENTOS	K1	K6	K3	PF	PC		
K20	5						
6.5	4.5	3.75	2.0	1.5	1.25		
	<b>2.0</b>	<b>2.75</b>	<b>4.5</b>	<b>5.0</b>	<b>5.3</b>	6.5	K20
			<b>2.5</b>	<b>3.0</b>	<b>3.3</b>	4.5	K15
			<b>1.75</b>	<b>2.25</b>	<b>2.55</b>	3.75	K6
						2.0	K3
						1.5	PC
						1.25	PF



**Fig. 7. Media y desviación estándar del número de estratos celulares en el mesófilo de lámina de la hoja (abaxiales al parénquima clorofílico). de plantas silvestres (PC y PF) y plántulas a las 12 semanas de cultivo en tratamientos de *T. erubescens* con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20).**

microscópica del fenómeno, el mismo autor menciona como evidencia la reducción en el parénquima de empalizada, un sistema lagunar muy desarrollado y el incremento del volumen celular. El citoplasma de las células de tejidos hiperhidratados es menos abundante y el estroma clorofílico está desplazado por lo regular no encontrándose circunscrito al área cercana a los haces vasculares. Otro signo en hiperhidratación es la drástica disociación de la pared celular, probablemente relacionada con el aumento de agua dentro de las células con una gran y concomitante presión hidrostática. Estas observaciones concuerdan con las realizadas en los cortes de la especie en estudio, principalmente el aumento del diámetro celular, provocado por el hinchamiento celular, la dificultad al hacer los cortes debida a la fragilidad de las paredes celulares, corrimiento del

parénquima clorofílico con una banda más ancha y cloroplastos desplazados a muchas de las células del mesofilo.

Como ya se mencionó, en el peso húmedo de las plántulas a las 12 semanas de desarrollo, no existió diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) y se observó que el peso estuvo más bien influenciado por la hiperhidricidad del tejido y no por desarrollo real de la plántula (Fig. 4).

El parénquima clorofílico mostró diferencias en todos los tratamientos. En las hojas de las plántulas del tratamiento K3 se observó una banda de parénquima clorofílico delgada y pálida que es interpretada como poco densa (Fig. 27 A). En el tratamiento K6 no existió una banda bien definida pues los cloroplastos se hallaban claramente dispersos en todo el mesofilo; sin embargo esta banda fue más densa que la del tratamiento K3 y con mayor número de hileras que cualquier otro tratamiento (Fig. 27 B). En el tratamiento K15 la banda está mejor definida a una sola hilera de células, también se puede observar cloroplastos dispersos en todas las células de mesófilo (Fig. 27C). En el tratamiento K20 se observó una capa celular densa bien definida con la mayoría de los cloroplastos acumulados en ella (Fig. 27D). A pesar de estas diferencias el análisis estadístico y la prueba de Tukey mostraron que sólo el tratamiento K6 fue diferente con respecto al resto (Tablas 11 y 12). Estos resultados evidencian que existe un mayor desplazamiento del parénquima clorofílico, en los tratamientos K6 que se traduce en claras tendencias de hiperhidricidad del tejido (Figs. 8 y 27 B)

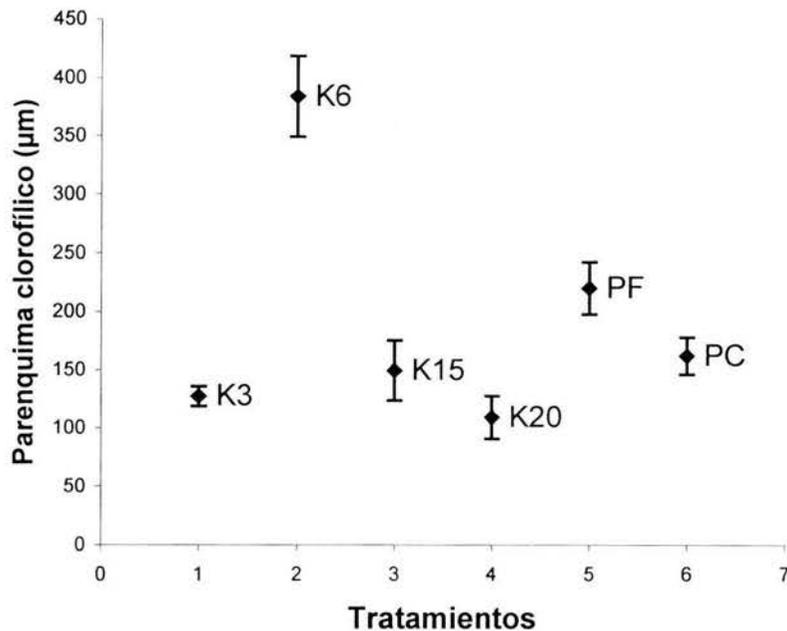
Como ya se mencionó, algunos estudios en cultivos *in vitro* concluyen que los carbohidratos en el medio de cultivo están relacionados con la actividad fotosintética (Grout, 1988 y Capellades *et al*; 1991) y se ha determinado que las plantas *in vitro* tienen bajos niveles de

**Tabla 11. Tamaño (  $\mu\text{m}$  ) del parénquima clorofílico de plántulas con 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) y plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (con negritas se muestran medias significativa).**

TRATAMIENTOS	X + S
K3	127.24 + 17.06
K6	<b>384.0 + 69.35</b>
K15	149.22 + 51.46
K20	108.86 + 37,13
PC	161.92 + 31.73
PF	220.04 + 44.88

**Tabla 12. Prueba de Tukey para evaluar la dimensión del parénquima clorofílico de plántulas con 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) y plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (con negritas se muestran valores significativos).**

K6	PF	PC	K15	K3	K20		
384	219.86	161.92	149.22	127.24	108.89		
	<b>164.14</b>	<b>222.1</b>	<b>234.79</b>	<b>256.76</b>	<b>275.11</b>	384	K6
		<b>57.9</b>	<b>70,64</b>	<b>92.62</b>	<b>110.97</b>	219.86	PF
						161.92	PC
						149.22	K15
						127.24	K3
						108.89	K20



**Fig. 8. Media y desviación estándar del grosor del parénquima clorofílico de plántulas a las 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) y plantas silvestres (PC y PF) de *T. erubescens***

fotosíntesis debido a limitaciones de CO<sub>2</sub>, baja iluminación y altos contenidos de azúcar en el medio. Sin embargo, Capellades *et al.*, 1990; 1991) demostraron que los altos niveles de sacarosa facilitan la adaptación *ex vitro* y que aunque propician una tasa fotosintética baja, la acumulación de almidón favorece la formación adecuada del parénquima clorofílico, el enraizamiento y la adaptación *ex vitro*, por lo que, la adición de sacarosa en el medio es benéfica.

Encontramos diferencias en el número de estratos celulares del mesófilo, En el tratamiento K3 se pudo observar un reducido número de estratos y células con mayor volumen (Figs. 6 y 7); esta respuesta pudo estar relacionada con la escasa concentración de sacarosa que

limitó la actividad de división celular. Las láminas foliares de plántulas del tratamiento K6 mostraron mayor número de estratos celulares, pero al mismo tiempo células con mayor volumen, lo que hizo que estas láminas mostraran una apariencia succulenta, signo propio del fenómeno de hiperhidratación .

En las láminas de las plántulas de los tratamientos K15 y K20 (Fig. 27 C y D) el número de estratos del mesófilo fueron similares al de las láminas de plantas silvestres (Figs. 26 A, B y 27 C), incluso se pueden observar escamas tricomas, (Fig. 27 D) las cuales están asociadas a funciones fisiológicas características del género como son: absorción de agua, regulación hídrica interna y protección ante la excesiva luminosidad.

Las características histológicas nos permitieron apreciar el papel organogénico y regulador de la sacarosa en los cultivos *in vitro*.

Puede suponerse que el diámetro y volumen celular se vieron modificados por las concentraciones de sacarosa. Las células de plántulas cultivadas en bajas concentraciones de sacarosa presentaron hinchamiento atribuido a cambios osmóticos regulados por los azúcares libres o por el adelgazamiento de la pared celular, por lo que la adición de sacarosa a los medios no debe ser menor a 1.5% para esta especie.

El tamaño y apariencia de las plántulas de los tratamientos K3 y K6 también reflejó la carencia de carbohidratos. El tamaño de las plántulas en el tratamiento K3 se vió reducido y en cuanto a su apariencia en el tratamiento K6 (Fig. 25 A) ésta se relacionó con características propias de la hiperhidratación, como son succulencia y translucencia en las láminas foliares.

El grosor de la lámina no estuvo relacionado con el número de estratos celulares, sino con el aumento del volumen celular y esto es un signo claro de hiperhidratación. El tratamiento K6 mostró una media mayor del grosor de la lámina (Tabla 13 y 14) comparable al

de plantas silvestres adultas; sin embargo, sólo fue un signo de hiperhidratación suculenta (Fig. 9).

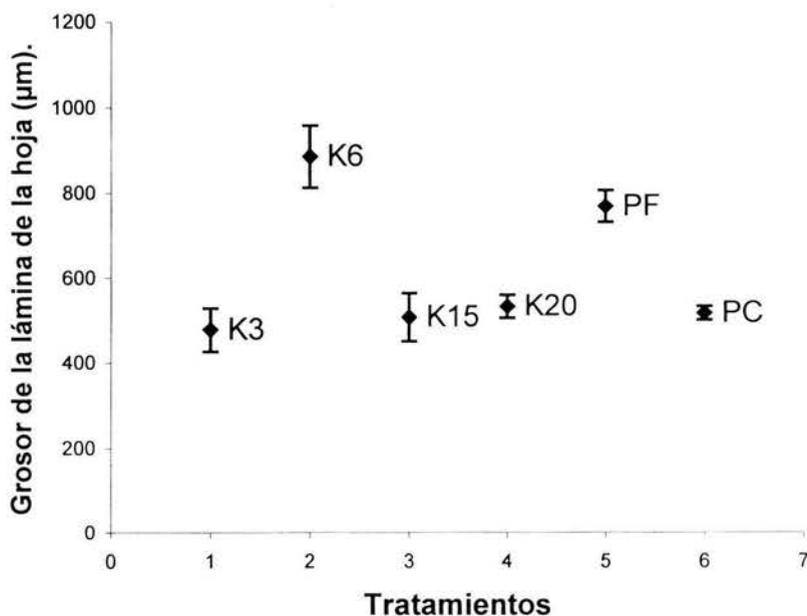
La banda del parénquima clorofílico mostró variación en su localización y distribución en la parte media del mesofilo, encontrándose dispersa o condensada dependiendo de las concentraciones de sacarosa. Pudo observarse un buen desarrollo de este parénquima en plántulas cultivadas con 1.5% de sacarosa (K15); sin embargo, cualitativa y cuantitativamente se observó un mejor desarrollo de las plántulas cultivadas en medios con concentraciones de 2% de sacarosa (K20); en los tratamientos con 0.3% este parénquima se vió muy reducido y en el tratamiento con 0.6% éste, aunque pareció amplio, presentó un desplazamiento de los cloroplastos hacia las células adyacentes a los haces vasculares en lugar de concentrarse alrededor de estos (Fig. 27 A, B, C y D).

**Tabla 13. Grosor de la lámina de la hoja ( $\mu\text{m}$ ) plántulas a las 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K3, K6, K15 y K20) y de plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (con negrita se muestran medias significativas).**

TRATAMIENTOS y PLANTAS SILVESTRES	$\bar{X} \pm S$
K3	477.54 $\pm$ 102.39
K6	<b>885.48 <math>\pm</math></b> 145.13
K15	507.12 $\pm$ 113.15
K20	532.78 $\pm$ 53.89
PC	517.15 $\pm$ 33.53
PF	<b>768.71 <math>\pm</math></b> 75.06

**Tabla 14. Prueba de Tukey para evaluar el grosor de lámina de la hoja plántulas a las 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K3, K6, K15 y K20) y de plantas silvestres (PC, PF) de *T. erubescens* (con negritas se muestran valores significativos).**

K6	PF	K20	PC	K15	K3		
885.48	768.70	532.78	517.18	507.12	477.5		
	<b>116.78</b>	<b>352.7</b>	<b>368.3</b>	<b>378.36</b>	<b>407.98</b>	885.48	K6
		<b>235.22</b>	<b>251.52</b>	<b>261.58</b>	<b>291.2</b>	768.70	PF
						532.78	K20
						517.18	PC
						507.12	K15
						477.5	K3



**Fig. 9. Media y desviación estándar del grosor de la lámina de la hoja de plántulas a las 12 semanas de cultivo en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K0, K3, K6, K15 y K20) y plantas silvestres (PC y PF) de *T. erubescens***

## CUANTIFICACION DE SACAROSA EN TEJIDO INTACTO

Se observó que la concentración de sacarosa en el tejido de las plántulas está directamente relacionada con la concentración de sacarosa del medio de cultivo. También se registró un aumento paulatino en la concentración de sacarosa en el tejido a través del tiempo de cultivo, hasta que éste alcanzó un valor máximo. Esto ocurrió a las 36 semanas del cultivo y después de la semana 40 sólo se registraron variaciones pequeñas del carbohidrato; lo que hace suponer que en ese momento las plántulas alcanzaron un desarrollo suficiente que las hizo menos dependientes de los carbohidratos del medio de cultivo (Fig. 10), aunque no se hicieron más pruebas para determinar ésta dependencia.

El objetivo inicial de la medición de sacarosa en el tejido fue hacer una correlación con posibles depósitos de carbohidratos en las células, los cuales no fueron encontrados con evidencia clara al hacer cortes histológicos y hacerlos reaccionar con lugol (Fig. 30 A). Algunos reportes como los de Mangat *et al.* (1990); Capellades *et al.* (1991), mencionaron la transformación de sacarosa en almidón de reserva el cual, es utilizado posteriormente en procesos organogénicos. En el caso de *Tillandsia erubescens* la estrategia de reserva de carbohidratos es diferente y estas no se acumulan en forma de almidón ya que al tratarse de una monocotiledónea las reservas son generalmente en forma de azúcar soluble y su existencia fue evidente con la prueba de antrona. No se pudo realizar otro tipo de análisis para evidenciar a los azúcares, pero los resultados marcan la pauta para continuar otros trabajos sobre metabolismo de carbohidratos en el género. Por otro lado el desarrollo *in vitro* de estas plántulas se incrementó con la adición de carbohidratos y por ende estos compuestos resultan ser determinantes en procesos

organogénicos.

En las secciones histológicas se pudo observar una tenue respuesta a la reacción con lugol (Fig. 29 A), y fue evidente sólo al eliminar la clorofila con un lavado de alcohol, estos depósitos se encontraron cerca de los haces vasculares, también cerca de ellos se detectaron con la técnica de tinción de Sudan III, gotas de aceite como otra forma más de material de reserva en el género. (Fig. 29 B).

Las plántulas en cultivo registraron cantidades de sacarosa en tejido mucho mayores que las plantas silvestres jóvenes; estas últimas presentaron contenidos del carbohidrato similares a las que tuvieron las plántulas que crecieron en los tratamientos con menor concentración de sacarosa K3 y K6, lo que parecería indicar que una estrategia energética de esta especie es utilizar los recursos según se presenten en la naturaleza, como lo hacen otras monocotiledóneas. También cabe la hipótesis propuesta por Thorpe y Meir (1972) citada por Gaurrinchon *et al.*(1996), en la cual los procesos organogénicos incrementan la respiración usando los carbohidratos de reserva por lo que en momentos de crecimiento las reservas son utilizadas de inmediato y no podríamos observarlas depositadas.

En la gráfica se puede observar que la concentración de sacarosa en el tejido fresco estuvo relacionada con la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (Fig. 10).

Como ya se dijo la sacarosa se relaciona con diversos procesos, como los organogénicos que conducen finalmente a obtener plántulas estructuralmente completas y más vigorosas (Fig. 25 B) y por lo tanto, un cultivo exitoso. También se relaciona con procesos de equilibrio osmótico que previenen la entrada de líquidos a la célula que conduce a eventos de hiperhidratación y que finalmente se traducen en pérdida del material cultivado (Pàques, 1991; Thorpe *et al.* 1986).

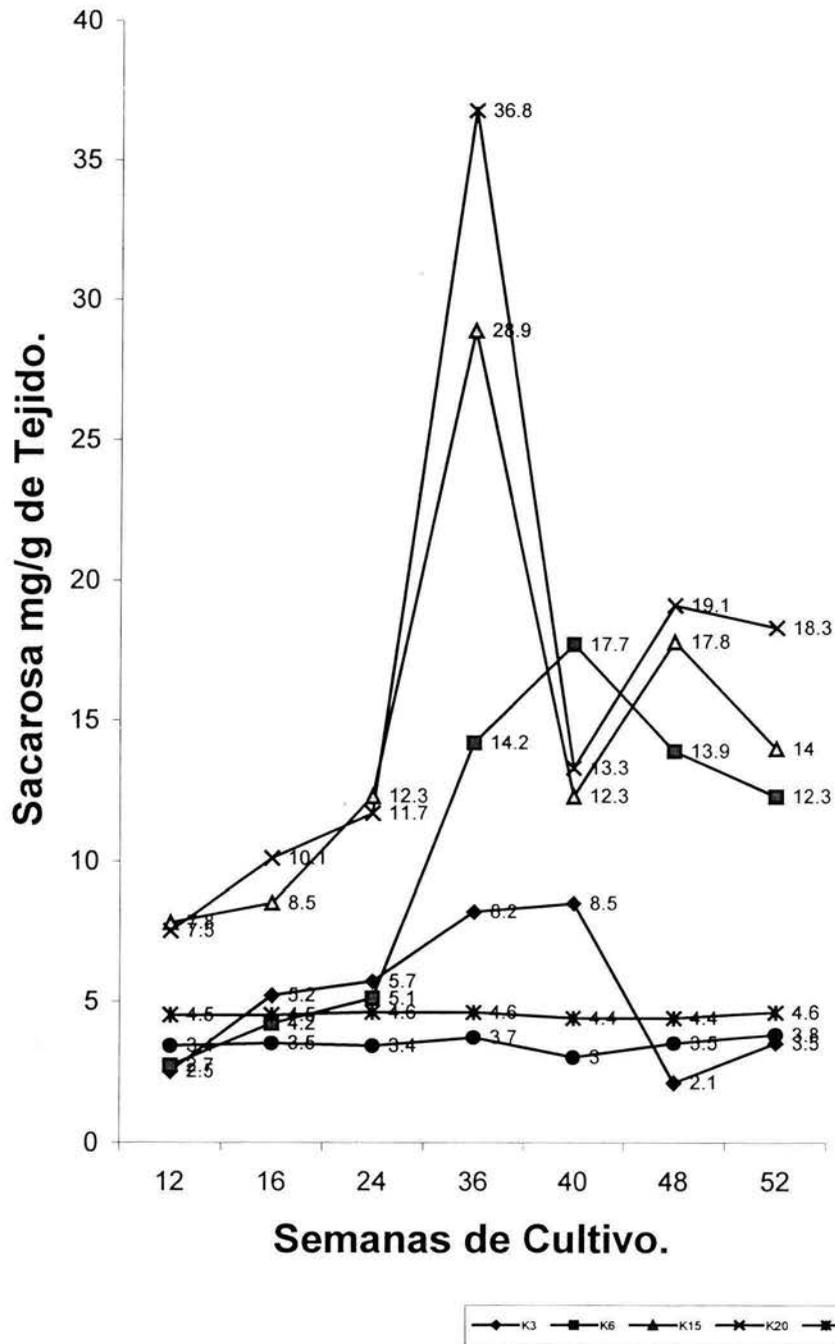


Fig. 10. Sacarosa en el tejido (mg /g de muestra) de plantas silvestres (PC y PF) y plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa ( K3, K6, K15, K20).

## ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS OBTENIDAS DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

La concentración de sacarosa afectó el desarrollo general de las plántulas y el enraizamiento no es una respuesta ajena a esta influencia. Moncousin (1991), mencionó que el enraizamiento está relacionado con múltiples factores externos entre los que se encuentran la composición de medio basal y la nutrición que ofrecen los carbohidratos, este autor hizo una amplia revisión sobre el enraizamiento en microcultivo en la que enumera una serie de factores que influyen en la rizogénesis, como: la concentración de sales minerales, que algunos autores sugieren debe disminuirse entre un 50% a un 75%; el nitrógeno que es un elemento muy importante que influencia la formación de raíces en algunos cultivos y que debe ser proporcionado en grado variable según la especie; el boro que es otro elemento importante por estar implicado con el transporte de carbohidratos también influye en el metabolismo de auxinas y fenoles que pueden inhibir la formación de la raíz, el aporte de carbono acelera los procesos de lignificación. El enraizamiento demanda continuas fuentes de azúcar, éste compuesto tiene una intervención bioquímica continua como soporte energético y también un efecto osmótico en las células, aunque algunos autores sugieren que las altas concentraciones de azúcar son negativas porque actúan como inhibidores de promotores (auxinas). Las concentraciones adecuadas de carbohidratos junto con las auxinas son los principales promotores del enraizamiento.

Existen muchos trabajos que han revisado los factores que influyen el proceso de enraizamiento, algunos autores mencionan a los carbohidratos, a la ausencia de luz o a la concentración de agar y a los aportes de nitrógeno (Davis y Potter. 1989; Infante *et al.* 1989; Gulsen y Dananoglu, 1991; Lipavská y Nátr, 1991 y Van Huylenbroeck y De Riek, 1995).

Gourichon *et al.* (1996) mencionaron que el agar impide la difusión y asimilación de la sacarosa del medio por lo que proponen los medios líquidos para promover su asimilación, también indicaron que no es posible la formación de raíces si la tasa fotosintética es reducida, si las radiaciones de luz son insuficientes y no existe aporte de sacarosa.

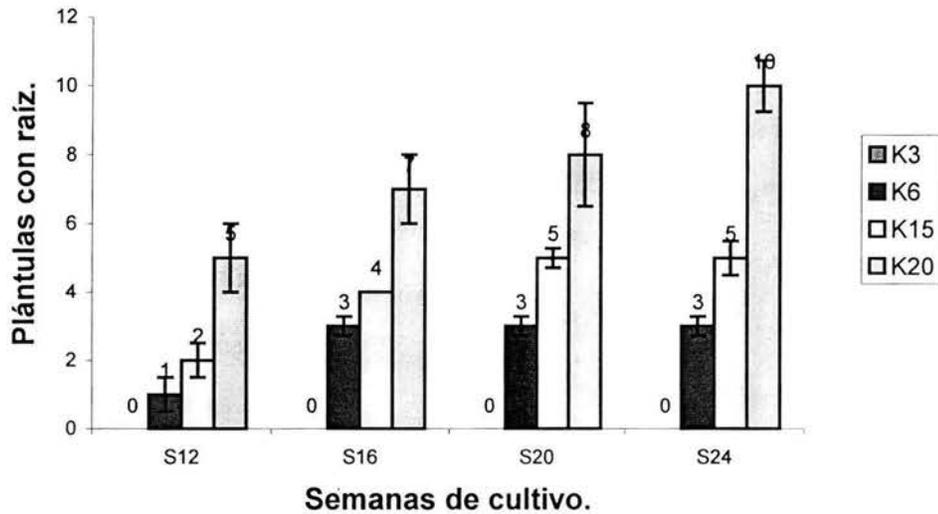
Considerando las características ecológicas de *Tillandsia* (epífitas o rupícolas) cabe mencionar que el papel de la raíz difiere, del resto de las plantas, en las que constituye un órgano de absorción y/o acumulación de reservas. El papel de las raíces en los epífitos estrictos es principalmente de sostén al sustrato o forofito, lo que puede modificar el criterio de evaluación del momento de la emergencia de la raíz, de su desarrollo y su función posterior.

En este trabajo, la aparición de las raíces en las plántulas obtenidas fue un evento posterior al rompimiento de la cubierta seminal y al desarrollo de la plántula y su aparición en el cultivo *in vitro* estuvo relacionada con la concentración de sacarosa en el medio (Fig. 25B). Las primeras raíces emergieron a las doce semanas de iniciado el cultivo a partir de semilla y la diferencia fue notable entre el número de plántulas con raíz emergente en los medios con mayor concentración de sacarosa en contraste con los medios que tuvieron menor concentración de ella. En cuanto al análisis de datos, se observó una variación significativa ( $p < 0.05$ ), al aumentar la concentración de sacarosa el número de plantas con raíces fue mayor, lo que hizo patente la influencia organogénica del azúcar y los procesos que con ella se generan.

En la Fig. 11 y Tabla 15 se puede apreciar que el tratamiento K20, con 2% de sacarosa, produjo el mayor número de plantas con raíz, en tanto que el tratamiento K3, con 0.3 % de sacarosa, no promovió el enraizamiento.

La aparición de raíces fue seguida hasta la semana 24 y pudo

observarse que el tratamiento K20 indujo un enraizamiento de 63% seguida de K15 con 30%, contrastando con el tratamiento K3 que no causo enraizamiento (Tabla 15).

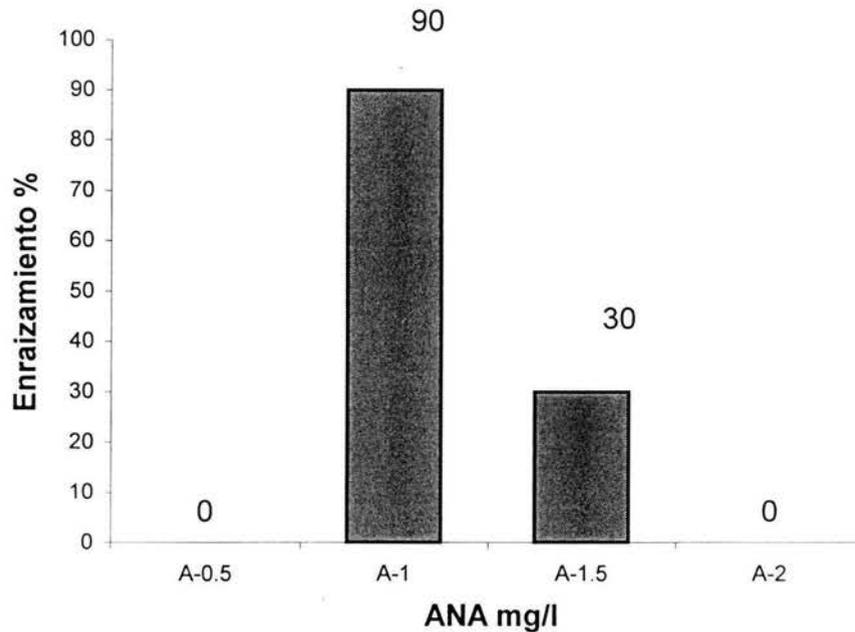


**Fig. 11. Enraizamiento de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa.**

Las plantas que no presentaron enraizamiento, después de 24 semanas de cultivo en el tratamiento K20, fueron subcultivadas en un tratamiento K20 adicionado con ANA (ácido naftalenacético) en concentraciones que variaron entre 0.5 mg/l a 2 mg/l (Tabla 16) debido a que ANA ha sido utilizada en la promoción de raíces en algunas bromeliáceas (Roger 1984 y Pierik *et al.* 1991).

En éste trabajo se pudo observar que las concentraciones de 1 mg/l promovieron el enraizamiento del 90% de las plántulas con nula oxidación y además un buen crecimiento apical (Figs. 12 y 34 B; Tabla 16). Las concentraciones menores a 1 mg/l no indujeron enraizamiento y sólo causaron un ligero crecimiento apical, tampoco presentaron oxidación. Las concentraciones con 1.5 mg/l mostraron

alto porcentaje de oxidación, 30 % de enraizamiento y formación de callo seguido de oxidación. Con 2 mg/l hubo nulo enraizamiento y oxidación total (Tabla 16).



**Fig. 12. Porcentaje de enraizamiento de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones del regulador ANA durante 30 días.**

La concentración de sacarosa entre 1.5% y 2% resultó un factor determinante para estimular el enraizamiento de *Tillandsia erubescens*. En forma complementaria la influencia del regulador de crecimiento ANA en concentraciones de 1mg/l resultó adecuada en la inducción del enraizamiento. La promoción de enraizamiento adventicio es universalmente aceptado para las auxinas, y su adición incrementa la formación de raíces, se tiene reportado que AIA y AIB son reguladores activos, que 2,4D es activo en monocotiledóneas, pero particularmente ANA ha mostrado buenos resultados en algunas bromeliáceas (Roger, 1984; Moncousin, 1991; Pierik y Sprenkel, 1991).

**Tabla 15. Enraizamiento in vitro de plántulas de *T. erubescens* con diferentes concentraciones de sacarosa (media y desviación estándar).**

TIEMPO (SEMANAS)	12	16	20	24
TRATAMIENTOS	— X ± S	— X ± S	— X ± S	— X ± S
K3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	<b>0 ± 0</b>
K6	1 ± 1	3 ± 0.57	3 ± 0.57	3 ± 0.57
K15	2 ± 1	4 ± 0	5 ± 0.57	5 ± 1
K20	5 ± 2	7 ± 2	8 ± 3	<b>10 ± 1.5</b>

**Tabla 16. Respuestas adicionales observadas en plántulas de *T. erubescens* en tratamientos con diferentes concentraciones del regulador ANA relacionadas con el enraizamiento mostrado en la Fig. 13.**

Concentración del regulador ANA mg/l	Enraizamiento	Crecimiento apical	Oxidación	Sin respuesta
0.5	0%	20%	0%	80%
1	<b>90%</b>	80%	10%	10%
1.5	30%	10%	50%	40%
2	0%	0%	100%	0%

## CUANTIFICACION DE CLOROFILA EN TEJIDO FRESCO.

Tomando en cuenta las características de apariencia externa de las plántulas y el análisis histológico se consideró conveniente hacer la cuantificación de clorofila a, b y t en tejido fresco. Las plántulas cultivadas en el tratamiento K3 mostraron poco vigor, menor tamaño y una coloración verde-amarillenta que contrastó con el resto de los tratamientos, en los que observamos un color verde más intenso (Fig. 25 A). Pudo observarse que existió variación en el contenido de clorofila en el tejido de las plántulas de los diferentes tratamientos y que se fue haciendo significativa a través del tiempo (Figs. 13, 14 y

15) El análisis indicó que la proporción de clorofila en las plántulas cultivadas en el tratamiento K20 fue cuatro veces mayor que la registrada en plántulas del tratamiento K3.

Pudo observarse que la sacarosa en el medio fue determinante en el desarrollo del parénquima clorofílico y se corroboró que un correcto y suficiente aporte de nutrimentos, específicamente carbohidratos, llevó a la producción de plántulas robustas, con parénquima clorofílico bien desarrollado y con concentraciones mayores de clorofila a, b y total.

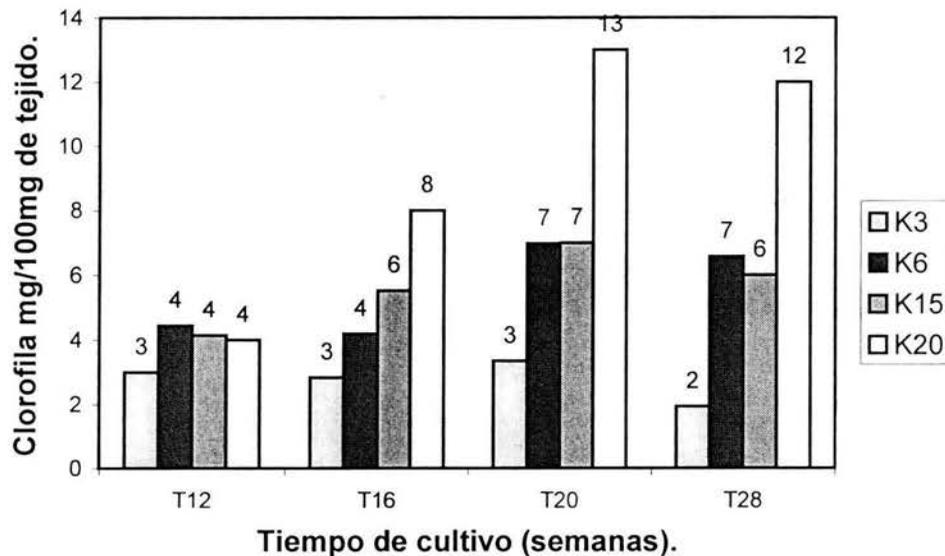
El desarrollo del parénquima clorofílico a su vez puede relacionarse con la capacidad fotosintética necesaria en el futuro desarrollo autotrófico de las plántulas.

A las 28 semanas de cultivo la clorofila total alcanzó el mayor valor registrado, sin embargo, estas concentraciones no tienen correlación con los valores determinados en las plantas silvestres (PC y PF) (Fig. 15).

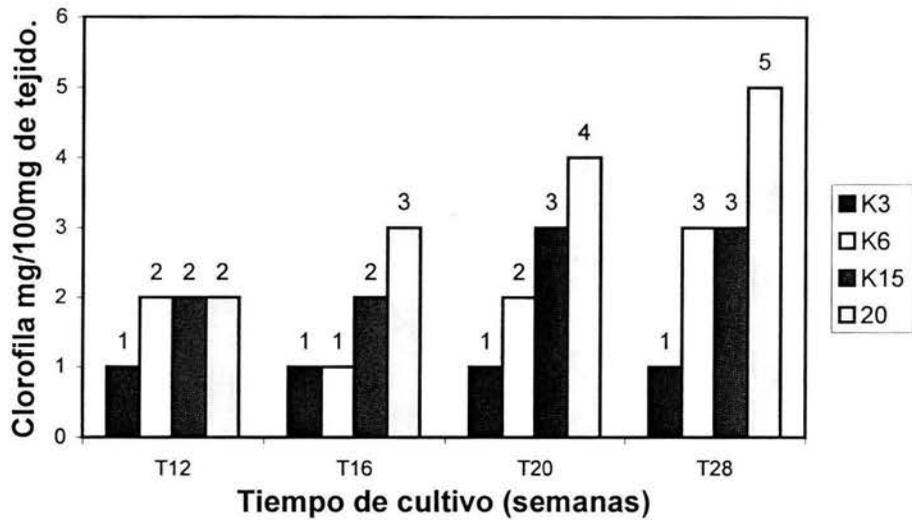
Dejardins (1995); Gourichon *et al.* (1996) han sugerido que la actividad fotosintética reducida que caracteriza a las plántulas cultivadas *in vitro* es una de las mayores limitaciones para una micropropagación eficiente y la aclimatización posterior. La disminución de la fotosíntesis *in vitro* puede relacionarse, con la baja concentración de CO<sub>2</sub> ambiental, la calidad de la luz y el aporte de azúcar exógeno. Otros autores como Dube y Vidaver. (1992) mencionaron que los niveles de clorofila no están directamente relacionados con tasas bajas de fotosíntesis y que algunos factores anatómicos tienen más impacto en la difusión de CO<sub>2</sub>, como presentar un mesofilo poco desarrollado, células de empalizada ausentes, epidermis delgada, estomas deformes y escasos o cloroplastos no diferenciados. En este trabajo se pudo relacionar el impacto del azúcar exógeno en la formación histológica del mesofilo y del parénquima clorofílico, lo que hace suponer que si bien el azúcar en exceso puede inhibir la fotosíntesis, el bajo aporte del mismo también

impacta el desarrollo histológico y a la larga, esto puede ser más perjudicial para estos procesos.

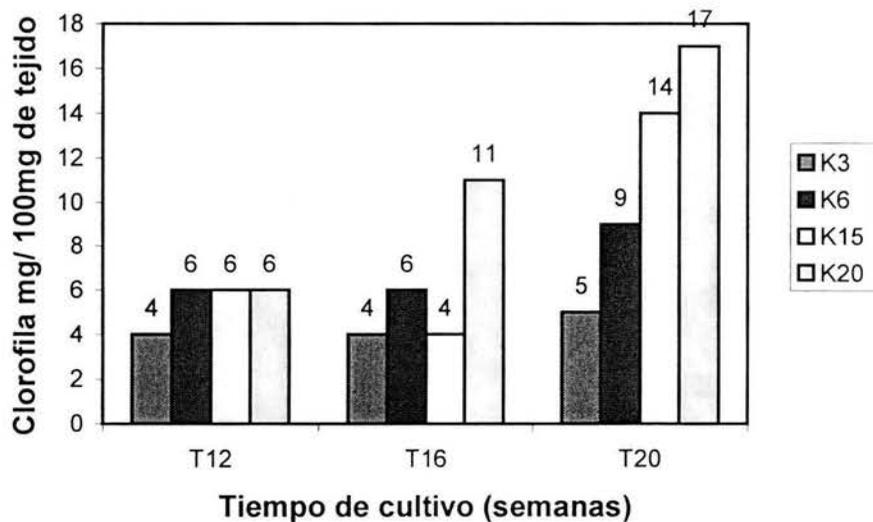
Golstein y Widholm, (1990) mencionaron que el azúcar exógeno inhibe la actividad de Rubisco. Gourichon *et al.* (1996) estudiaron la actividad del fosfoenolpiruvato y de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxygenasa, encontrando que los factores limitantes en el funcionamiento de estas son la radiación luminosa y los niveles de CO<sub>2</sub>. La sacarosa parece favorecer la acción de la ribulosa 1,5 bifosfato, aunque cabe mencionar que no hay muchos reportes de la actividad enzimática de plantas cultivadas *in vitro* y se requiere de más estudios para explicar estos procesos.



**Fig. 13. Clorofila (a) en tejido fresco de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa ( K3, 0.3%, K6 0.6%, K15 1.5% y K20 2%).**



**Fig. 14. Clorofila (b) en tejido fresco de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa (K3 0.3%, K6 0.6%, K15 1.5% y K20 2%).**



**Fig. 15. Clorofila (t) en tejido fresco de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes tratamientos de sacarosa (K3 0.3%, K6 0.6%, K15 1.5% y K20 2%).**

## CULTIVO DE PLÁNTULAS DERIVADAS DE APICES DE TALLO.

Después de varias pruebas preliminares de cultivo y considerando los antecedentes referentes al género, se usaron diferentes concentraciones combinadas de ANA y BAP, como se indicó en la metodología para determinar la influencia de los reguladores en diferentes concentraciones. El medio MS fue preparado en el laboratorio siguiendo las especificaciones de Sigma conforme a la formulación M- 5519. Se utilizó inicialmente en su composición y concentración original, después fue modificado debido a que los resultados obtenidos en la primera fase del trabajo mostraron, tasas elevadas de aparición de signos de hiperhidratación y oxidación en el desarrollo de los ápices de tallo, logrando sobrevivir pocos de ellos. Así, fue como se consideró finalmente la necesidad de reducir a la mitad, la concentración de macrosales de la fórmula original.

### NÚMERO DE BROTES

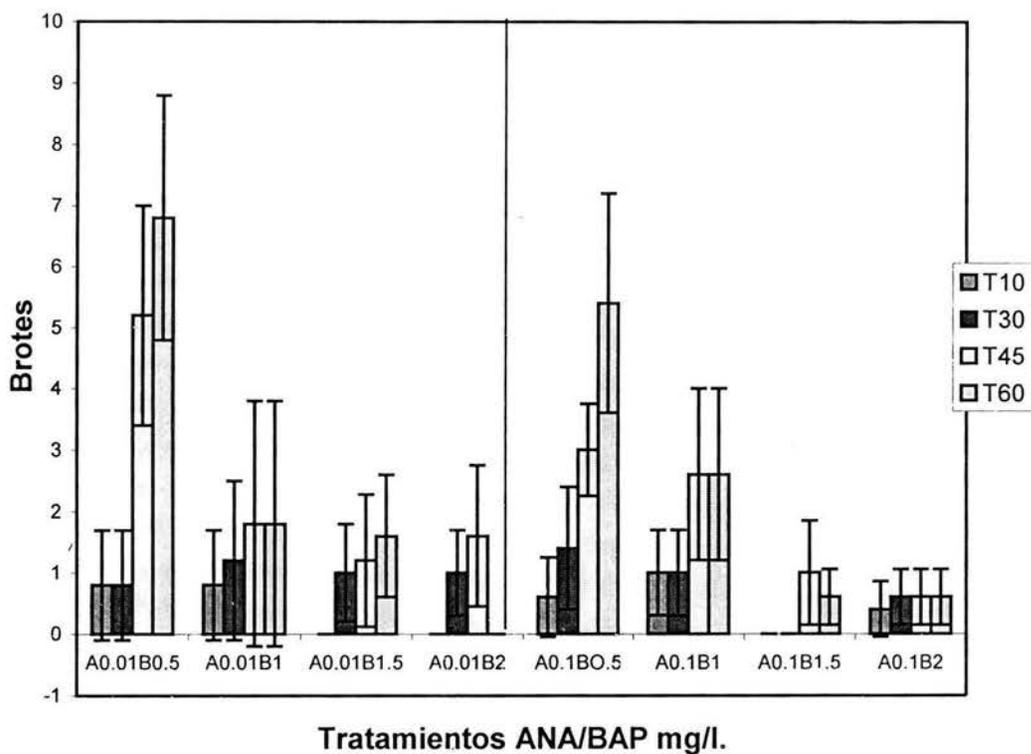
Para cuantificar el número de brotes regenerados se consideraron cuatro periodos: 10, 30, 45, y 60 días. Del análisis de varianza se observó una diferencia significativa ( $p= 0.0046$ ) para la triple interacción (ANA- BAP-Tiempo). En la Fig. 16 y la Tabla 17 se puede observar que la mejor combinación fue la de ANA 0.01mg/l con BAP 0.5 mg/l en un tiempo de 60 días con un promedio de  $6.8 \pm 4.03$  brotes, siguiendo ANA 0.1 mg/l con BAP 0.5 mg/l en un tiempo de 60 días con una media de  $5.4 \pm 3.63$  brotes, estas combinaciones fueron las que tuvieron una mejor respuesta en la formación de brotes laterales y la diferencia se hizo evidente a través del tiempo de cultivo. La combinación ANA 0.1 con BAP 1mg/l presentó buena respuesta en la formación de brotes laterales y esta se manifestó a partir de los 45 días de cultivo y pudo considerarse una combinación adecuada para inducir crecimiento lateral. Con el uso de concentraciones más elevadas del regulador BAP, se propiciaron

eventos de hiperhidratación y oxidación del material, por lo que se sugiere su uso en concentraciones moderadas y por tiempos no menores a 45 días, ni mayores de 60. Algunos autores reportan que algunos de los efectos secundarios del regulador BAP son la aparición de síntomas de hiperhidratación y la oxidación de tejidos. (Moncousin 1991 y Pàques, 1991). A pesar de que sólo después de 45 días de cultivo en presencia del regulador se evidenció un efecto sobre el número de brotes, se debe considerar que los tiempos de más de 60 días de exposición al regulador BAP, no fueron benéficos para el cultivo y se debe considerar la posibilidad de intercalar periodos de cultivo sin reguladores, antes de usar otra o la misma combinación de reguladores. Franklet, (1991) mencionó que el regulador BAP provoca un proceso de rejuvenecimiento celular que podría favorecer el enraizamiento de las plántulas, pero que también reduce la capacidad organogénica, causando hiperhidricidad e induciendo a la oxidación del material en cultivo.

Considerando las revisiones y los resultados obtenidos en este trabajo se puede decir que para esta especie de *Tillandsia* las concentraciones más adecuadas fueron las más bajas o sea donde BAP se encuentra entre 0.5 y 1 mg/l. al parecer la influencia de ANA no fue muy diferente aunque un grupo de tratamientos contuviera diez veces más del regulador sin embargo la acción sinérgica de auxinas y citocininas es reconocida.

Las concentraciones elevadas de BAP 1.5 a 2 mg/l indujeron más síntomas de hiperhidratación oxidación y deterioro total del material, algunos autores reportan que también las sales minerales de los medios de cultivo nos pueden llevar a esta respuesta pero en este trabajo se disminuyó esta influencia reduciendo a la mitad la concentración de macrosales. La humedad relativa de los medios también puede conducir a los cultivos *in vitro* hacia la hiperhidratación y oxidación, en este trabajo se usaron sólo medios

sólidos y con ello se redujeron riesgos.



**Fig. 16. Media y una desviación estándar de número de brotes derivados de ápices de tallo de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores.**

**Tabla 17. Media y una desviación estándar del número de brotes por explante en el cultivo de ápices de tallo de *T. erubescens* en tratamientos con diferentes combinaciones de reguladores.**

ANA mg/l	BAP mg/l.	TIEMPO DE CULTIVO (DÍAS)	$X \pm S$
0.01	0.5	10	$0.8 \pm 1.78$
	0.5	30	$0.8 \pm 1.78$
	0.5	45	<b><math>5.2 \pm 3.7</math></b>
	0.5	60	<b><math>6.8 \pm 4.0</math></b>
	1.0	10	$0.8 \pm 1.78$
	1.0	30	$1.2 \pm 2.6$
	1.0	45	$1.8 \pm 4.0$
	1.0	60	$1.8 \pm 4.0$
	1.5	10	$0 \pm 0$
	1.5	30	$1.0 \pm 1.7$
	1.5	45	$1.2 \pm 2.16$
	1.5	60	$1.6 \pm 2.07$
	2.0	10	$0 \pm 0$
	2.0	30	$1 \pm 1.4$
	2.0	45	$1.6 \pm 2.3$
	2.0	60	$0 \pm 0$
0.1	0.5	10	$0.6 \pm 1.3$
	0.5	30	$1.4 \pm 1.9$
	0.5	45	$3.0 \pm 1.5$
	0.5	60	<b><math>5.4 \pm 3.6</math></b>
	1.0	10	$1.0 \pm 1.4$
	1.0	30	$1.0 \pm 1.4$
	1.0	45	$2.6 \pm 2.8$
	1.0	60	<b><math>2.6 \pm 2.8</math></b>
	1.5	10	$0 \pm 0$
	1.5	30	$0 \pm 0$
	1.5	45	$1 \pm 1.7$
	1.5	60	$0.6 \pm 0.89$
	2.0	10	$0.4 \pm 0.89$
	2.0	30	$0.6 \pm 0.89$
	2.0	45	$0.6 \pm 0.89$
	2.0	60	$0.6 \pm 0.89$

## PESO HUMEDO DE BROTES

El peso húmedo de los ápices de tallo se registró en dos tiempos: 30 y 60 días. En el tiempo inicial sólo se pesaron algunos ápices al azar y el promedio de estos fue 125 mg, no se pesaron todos los ápices para evitar la contaminación de los mismos. El registro del peso sólo se realizó en dos periodos para reducir riesgos de contaminación y pérdida de material.

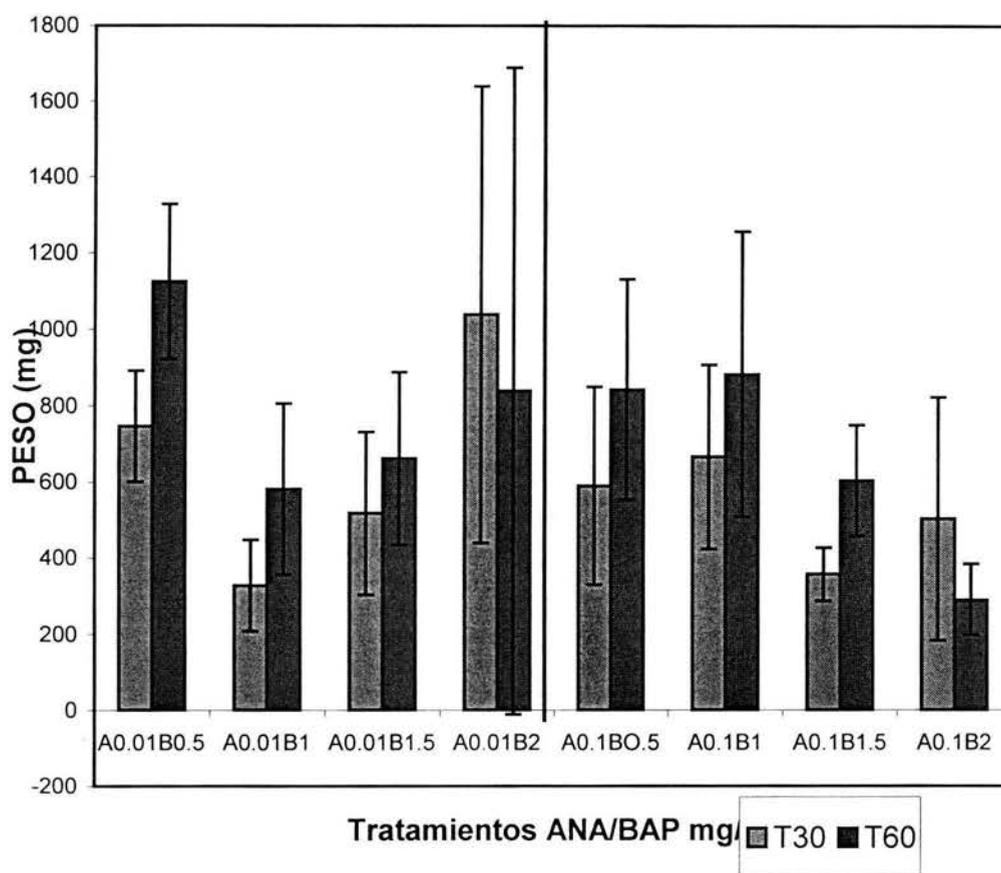
En ninguno de los tiempos de medición existió una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) que indicara qué tratamiento propiciaba una mejor respuesta en relación con la ganancia de peso, la media mayor se registró cuando se cumplieron 60 días de cultivo y el tratamiento ANA 0.01 con BAP 0.5mg/l con una media de 1125.60 mg  $\pm$  404.992 mg (Tabla 18 y Fig. 17).

El resultado del peso estuvo relacionado con el desarrollo general del cultivo por lo que el número de brotes y el crecimiento apical se vieron reflejados en el peso registrado.

Observaciones cualitativas ayudaron a percibir que la combinación ANA 0.01 con BAP 2.0 mg/l causó una respuesta irregular que tuvo que ver con las características morfológicas del material de origen (plantas de campo muy vigorosas), a los 60 días de cultivo el 60% del material presentaba oxidación; 20% hiperhidratación y solamente un 20% se encontró en buen estado. Sin embargo, este último porcentaje tuvo un desarrollo excepcional quizá porque provenía de plantas que aunque tenían el tamaño estipulado para este trabajo eran muy vigorosas, finalmente esto se vió reflejado en los resultados del análisis estadístico. Lo anterior permitió observar que es muy importante registrar las características de las plantas de las que se obtienen los ápices de tallo ya que, además de los reguladores, éste es otro factor que puede influenciar los resultados.

Las combinaciones con BAP 0.5 mg/l registraron una mejor respuesta en el peso húmedo. En las combinaciones con 2 mg de BAP se pudo

observar que del primer al segundo tiempo de medición hay un decaimiento en el peso que fue debido a la oxidación del material y deterioro del tejido, la desviación estándar mostró valores muy altos lo que confirma la variación de los resultados.



**Fig. 17. Peso de plántulas derivadas de ápices de tallo de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores.**

**Tabla 18. Media y una desviación estándar del peso (mg) de plántulas derivadas de meristemos de *T. erubescens* cultivadas en diferentes concentraciones de dos reguladores de crecimiento (con negritas se muestran medias significativas).**

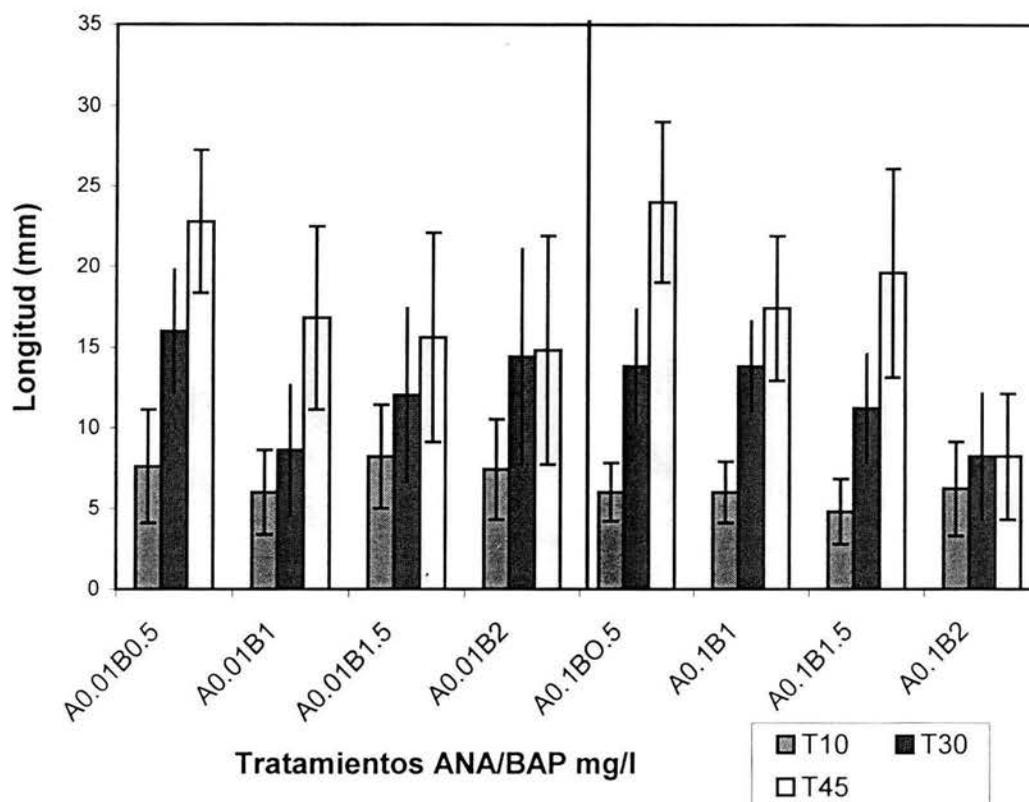
ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	TIEMPO DE CULTIVO (días)	X $\pm$ S (mg)
0.01	0.5	30	746.8 $\pm$ 286.05
	0.5	60	<b>1125.6 <math>\pm</math> 404.9</b>
	1.0	30	327.6 $\pm$ 238.8
	1.0	60	580.8 $\pm$ 450
	1.5	30	517.4 $\pm$ 425.8
	1.5	60	661.2 $\pm$ 508.9
	2.0	30	<b>1039.2 <math>\pm</math> 1192.6</b>
	2.0	60	839.2 $\pm$ 1699.1
0.1	0.5	30	589.4 $\pm$ 520.6
	0.5	60	<b>841.4 <math>\pm</math> 579.5</b>
	1.0	30	665.2 $\pm$ 482.6
	1.0	60	<b>881.2 <math>\pm</math> 749.4</b>
	1.5	30	357.4 $\pm$ 139.4
	1.5	60	603.2 $\pm$ 290.2
	2.0	30	502.4 $\pm$ 639.97
	2.0	60	290.4 $\pm$ 187.67

#### CRECIMIENTO APICAL

El crecimiento apical fue registrado en tres periodos: 10, 30 y 45 días, tomándose como referencia sólo el crecimiento central, sin considerar el crecimiento de cada uno de los brotes laterales.

En el crecimiento apical sólo se observó una diferencia significativa ( $p= 0.00002$ ) después de 45 días con un promedio de 22.8 mm  $\pm$  8.90. En la Tabla 19 y en la Fig. 18, se puede observar que la combinación que causó mejores resultados fue ANA (0.1 mg/l con BAP (0.5 mg/l) al cabo de 45 días, con un promedio de 24 mm  $\pm$  12.02, siguiendo ANA (0.01 mg/l con BAP 0.5 mg/l.) y no se observó diferencia estadística en las combinaciones ( $p < 0.05$ ). Esto se debe a que sólo se consideró la longitud del crecimiento y no el grosor del mismo, el tratamiento ANA 0.1 mg/l con BAP 2 mg/l mostró los valores más bajos ya que aquí se registraron los índices de oxidación

más altos, en ANA 0.01 mg/l con BAP 2 mg/l también ocurrió algo similar aunque aquí los brotes vigorosos resistieron más a la oxidación, aunque detuvieron su crecimiento.



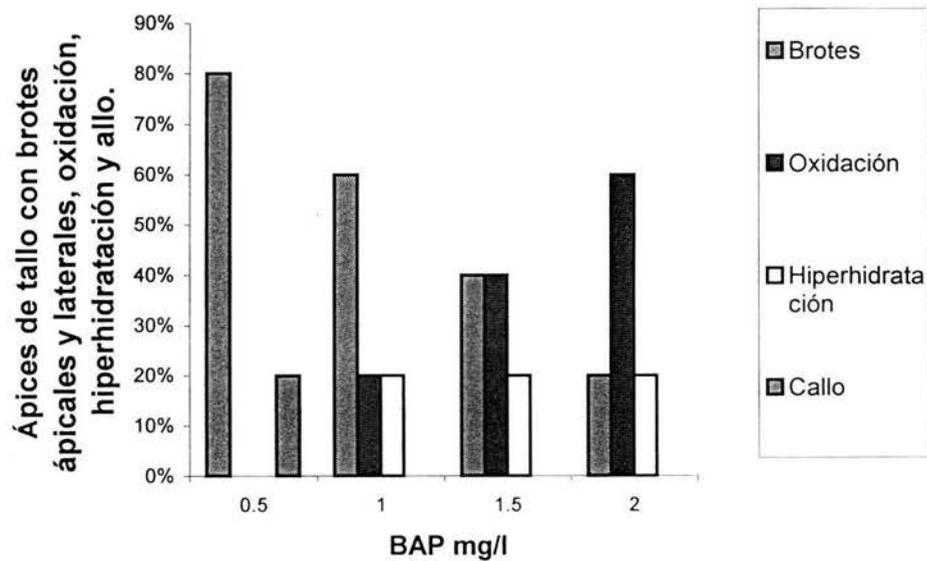
**Fig. 18. Crecimiento ápcial (mm) de plántulas de *T. erubescens* derivadas de ápices de tallo, cultivadas en tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento, en tres tiempos de medición (días).**

Las observaciones cualitativas estuvieron enfocadas a detectar síntomas de hiperhidratación, oxidación, buen desarrollo de plántulas y formación de callo, estas respuestas se consideraron a los 50 días de cultivo. Fue posible constatar que las combinaciones hormonales que contenían BAP 0.5mg/l mostraron un 80% de plantas con buen desarrollo, sin signos aparentes de deterioro. La concentración BAP 1mg/l permitió observar 60% de plántulas en buen estado, mientras

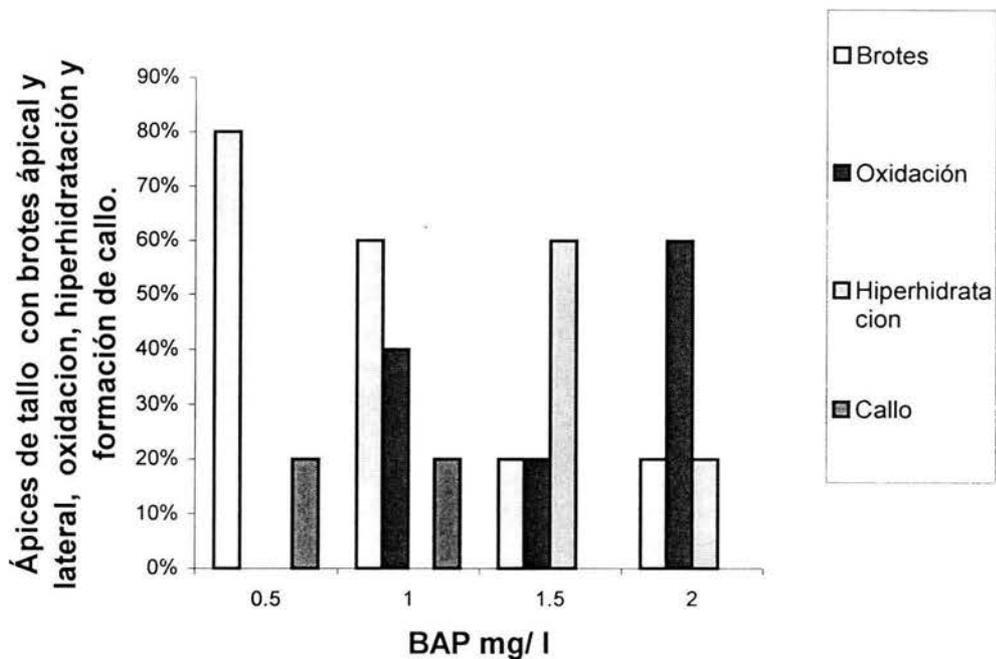
que el resto de las combinaciones, sólo produjeron un 20% de plantas en buen estado (Figs. 19, 20 y 32 B). La oxidación más alta se registró en combinaciones donde BAP se encontró en la concentración de 2 mg/l. (Figs. 19 y 20).

La hiperhidratación empezó a hacerse manifiesta en algunos casos con concentraciones de 1 mg/l de BAP ( Fig. 19) y en otros, a partir de 1.5 mg/l (Fig. 20).

El callo sólo se formó en concentraciones bajas de BAP de 0.5 a 1 mg/l



**Fig. 19. Respuestas cualitativas a la interacción de los reguladores ANA 0.01mg/l y BAP de 0.5 a 2 mg/l, en el cultivo de ápices de tallo de *T. erubescens* después de 50 días de cultivo.**



**Fig. 20. Respuestas cualitativas a la interacción de los reguladores ANA 0.1 mg./l. y BAP de 0.5 a 2 mg./l. en el cultivo de ápices de tallo de *T erubescens* después de 50 días de cultivo.**

Pàques (1991), en su revisión sobre la hiperhidratación enuncia entre los posibles factores que la causan está la estimulación con citocininas y considera a la bencil-aminopurina como una de las hormonas más activas en la promoción de la misma, otros factores involucrados son la humedad relativa y el tipo y concentración de agentes gelificantes. En este estudio parece que BAP pudo estar más relacionada con procesos de hiperhidratación, ya que los resultados llevaron a observar que a mayor concentración del regulador hubo más plantas hiperhidratadas u oxidadas.

Otro factor de riesgo de hiperhidratación lo constituyen las altas concentraciones de sales de amonio y por ello el medio MS es considerado causante de ésta (Debergh, 1983). Este efecto fue minimizado en este trabajo reduciendo de la formula original la concentración de macrosales. Los cultivos se realizaron en medios

sólidos para disminuir la humedad relativa y no sumar factores de posible hiperhidratación. Otro factor importante en el cultivo fue el fotoperiodo de 16/8 luz-oscuridad y para optimizar la luminosidad se usaron tapas transparentes de polipropileno que no bloquearon la luz de las lámparas para que la iluminación pudiera mantenerse en  $34 \mu\text{mol m}^2/\text{s}^{-1}$ .

Se observó que la combinación ANA 0.01 y BAP 0.5 mg/l fue la mejor en la propagación de ápices de tallo de la especie en estudio, ya que permitió obtener resultados satisfactorios (Figs. 31 y 32), mostrando un buen equilibrio entre la aparición de brotes laterales y crecimiento apical. En general, el desarrollo de los organismos con esta concentración fue adecuado y la hiperhidratación y oxidación pudieron considerarse mínimos.

Basándose en Franklet, (1991) y en nuestros resultados el tiempo de exposición a BAP para esta especie debe reducirse a periodos de 45 días con el fin de minimizar los efectos colaterales de este regulador. El tiempo prolongado de exposición a este regulador de crecimiento produjo un efecto negativo que se tradujo en hiperhidratación y el fracaso de la fase de enraizamiento.

El cultivo a través de ápices de tallo es un procedimiento que permite producir plantas en tiempos más cortos que por la vía de la germinación, lo que conduce a pensar que es un método conveniente, aunque se deba tener un cuidado muy riguroso en la elección de los medios de cultivo y reguladores de crecimiento, considerando el tipo y tiempo de exposición de estos, también se debe establecer la concentración y tipo de agentes gelificadores y la luminosidad adecuada para cada especie.

La mayor parte de los antecedentes proponen la propagación de especies del género *Tillandsia* a través de semilla, pero este método tiene el inconveniente de una larga espera para obtener ejemplares adultos, aunque supone mayor variabilidad genética La propagación a

través de ápices de tallo propuesta por Pierik y Sprenkel. (1991) fue sugerida para una especie originaria de Sudamérica con cualidades ornamentales muy valoradas. Estos autores realizaron su trabajo para incrementar la producción de *T.cyanea* en viveros holandeses con muy buenos resultados, por lo que constituye un importante antecedente. Debe mencionarse sin embargo, que dicha metodología propuesta no se ajustó totalmente a los requerimientos de la especie aquí estudiada. Las dos especies difieren, en características morfológicas y fisiológicas y son de tipos ecológicos diferentes.

México cuenta con una amplia diversidad de especies del género, la mayor que cualquier otro país de América: 189 especies de las 440 especies registradas para el continente lo que representa el 42.9%, muchas de ellas son endémicas. Además de la diversidad en nuestro país, existen grupos de Tilladsias con diferentes tendencias ecológicas lo que supone requerimientos diferentes y especiales para cada especie, sin embargo, agrupándolas en ecotipos podemos pensar que la metodología propuesta en este trabajo resultó una buena herramienta para la propagación de especies del género con características similares a la especie estudiada, que puede convertirse en una alternativa de propagación rápida, con perspectivas de conservación *ex situ* con posibilidades económicas.

**Tabla 19. Crecimiento apical de plántulas derivadas de ápices de tallo de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (en negritas se muestran valores significativos).**

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	TIEMPO DE CULTIVO (días)	X ± S
0.01	0.5	10	7.6 + 7.0
		30	16.0 + 7.7
		45	<b>22.8 + 8.9</b>
	1.0	10	6.0 + 5.3
		30	8.6 + 8.0
		45	16.8 + 11.5
	1.5	10	8,2 + 6.4
		30	12 + 10,75
		45	15.6 + 13.0
2.0	10	7.4 + 6.2	
	30	14,4 + 13.35	
	45	14.8 + 14.3	
0.1	0.5	10	6.0 + 3.7
		30	13.8 + 7.0
		45	<b>24 + 12.02</b>
	1.0	10	6.0 + 3.8
		30	13.8 + 5.6
		45	17.4 + 9.01
	1.5	10	4.8 + 4.1
		30	11.2 + 6.7
		45	19.6 + 13.1
	2.0	10	6.2 + 5.8
		30	8.2 + 7.8
		45	8.2 + 7.8

## ENRAIZAMIENTO DE PLÁNTULAS DERIVADAS DE ÁPICES DE TALLO.

El enraizamiento de plántulas derivadas de ápices de tallo mostró resultados diferentes al enraizamiento de plántulas germinadas a partir de semilla, aquí se realizaron dos pruebas con tres reguladores, ANA, IBA Y ANIA (p-Nitrofenil indolacético éster). Cada regulador fue

usado en 3 concentraciones: 0.5, 1, y 1.5mg/l y se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

La primera prueba (P1) se realizó de forma inmediata al uso de BAP después de la etapa de multiplicación de brotes y los resultados mostraron que el regulador ANA no promovió respuestas de enraizamiento en ninguna de las concentraciones ofrecidas, a pesar del excelente resultado obtenido en plántulas derivadas de germinación.

Con IBA se obtuvieron buenos resultados sólo después de cuatro meses de exposición y únicamente en la concentración de 1 mg/l, causando el 100% de enraizamiento, pero con tiempos de exposición muy largos (Tabla 20).

Con ANIA 1 mg/l se obtuvieron resultados del 66% de enraizamiento en dos meses de exposición al regulador. Sin embargo su influencia prolongada causó oxidación y pérdida total del material, por esta razón se debe considerar su uso por tiempos cortos y promover un rápido trasplante a un medio libre de reguladores a fin de conservar el éxito obtenido inicialmente (Fig. 34A).

**Tabla 20. Prueba 1 (P1). Porcentaje de enraizamiento de plántulas derivadas del cultivo de ápices de tallo de *T. erubescens* en tratamientos con tres reguladores de tratamiento**

mg/l	ANA	IBA	ANIA
0.5	0%	0%	0%
1	0%	100	66%
1.5	0%	0%	0%

En la segunda prueba (P2) las plántulas derivadas de ápices de tallo fueron cultivadas en un medio libre de reguladores durante 30 días con la finalidad de disminuir la posible interacción del regulador BAP, a este periodo se le denominó como etapa de "desintoxicación". Tomando en cuenta los resultados de la primera prueba y debido

también a la limitación del número de plántulas disponibles, se usaron los reguladores ANA ANIA e IBA, sólo en la concentración 1mg/l con tres repeticiones por tratamiento.

Los resultados fueron diferentes y se observaron respuestas más rápidas: con ANA se obtuvo un enraizamiento del 100% en un periodo de 23 días; con IBA se obtuvo enraizamiento del 66% en 35 días y con ANIA no se obtuvo enraizamiento y sí efectos de oxidación (Tabla 21, Fig. 25).

**Tabla 21. Prueba 2 (P2). Enraizamiento de plántulas derivadas de ápices de tallo de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento después de un intercultivo sin reguladores.**

mg/l	ANA	IBA	ANIA
1mg/l	100%	66%	0%

En la Tabla 22 se muestra el tiempo de respuesta de las dos pruebas realizadas prueba 1 sin etapa de "desintoxicación" (P1) y prueba 2 con etapa de "desintoxicación" (P2).

**Tabla 22. Tiempo de respuesta de enraizamiento a reguladores bajo diferentes condiciones de cultivo (P1 y P2)**

Tratamiento	ANA 1 mg/l	IBA 1 mg/l	ANIA 1 mg/l
Prueba	#Días	#Días	#Días
P(1)	Sin respuesta	120	60
P(2)	23	35	Sin respuesta

Los resultados obtenidos pueden relacionarse con las revisiones y los argumentos de Franklet (1991), Moncousin (1991) y Pàques (1991) quienes analizaron los efectos positivos y negativos del regulador BAP: 1) propiciar rejuvenecimiento celular (lo que pronostica éxito en el posterior enraizamiento), aunque el exceso de rejuvenecimiento celular induce a la hiperhidratación del tejido y el fracaso del

enraizamiento y 2) la posibilidad de conservar la capacidad de rejuvenecimiento celular, alternando el tratamiento con BAP y el tratamiento sin reguladores. Esto último llevó a pensar en un periodo de "desintoxicación" en el que se disminuyera la influencia de BAP sin que se perdieran las características de rejuvenecimiento celular adquiridas.

Una propuesta en esta fase del trabajo fue establecer una etapa de "desintoxicación" que permitiera valorar la influencia real de un segundo regulador de crecimiento, sin la influencia del primero.

La acción de los reguladores de enraizamiento fue modificada totalmente con la etapa de "desintoxicación", siendo acelerada la acción de los reguladores usados y volviendo a ser ANA el regulador de enraizamiento más efectivo como ya lo había mostrado ser en el enraizamiento de plántulas derivadas de la germinación. Para *Tillandsia erubescens* la concentración óptima de enraizamiento es de 1 mg/l de ácido naftalenacético, las concentraciones mayores producen la oxidación total del material. Pudo observarse que la influencia de ANA en 1 mg/l estimuló además de raíces un crecimiento apical notorio que puede verse en la Fig.34 B.

Pierik (1991) realizó la propagación de ápices de *T. cyanea* como ya se mencionó y en cuanto al enraizamiento señaló que la concentración óptima que lo produjo fue 0.8 mg/l de ANA; otra conclusión a la que llegó fue que la concentración elevada de la combinación citocinina/auxina indujo a la formación de callos y brotes adventicios.

## FORMACIÓN DE CALLOS

Se observó que durante la germinación de las semillas algunas presentaron una emergencia irregular (Fig. 23 B y C). Este crecimiento podía llevar a una rápida oxidación y muerte del tejido, o bien al desarrollo de una masa amorfa de características gelatinosas

(callo). Si estas masas eran cultivadas en medios con BAP 0.5 mg/l el crecimiento del callo resultaba abundante (Fig. 36 A). Mekers (1977) reportó que la regeneración de plántulas de varias especies de *Tillandsia* a partir de callos se logra con la adición de ANA en concentraciones de 1 mg/l. Sin embargo, en la especie aquí estudiada no se lograron buenos resultados con dicho regulador, en esa u otra concentración, aunque las secciones histológicas de callo mostraron que la influencia de ANA (1 mg/l) produjo áreas de división celular que podrían inducir a la regeneración de plántulas (Fig. 35 D). Los mejores resultados regenerativos de plántulas a partir de callo se lograron reduciendo drásticamente los niveles de humedad en los medios de cultivo (Fig.35 B).

En el cultivo de ápices de tallo también se obtuvo callo, principalmente en medios de cultivo con concentraciones de 0.5 mg /l de BAP. A pesar de que la regeneración a partir de callos no formó parte de los objetivos de este trabajo, la obtención de plantas por esta vía, complementaría la metodología propuesta en este trabajo sumándola a la regeneración obtenida a través de ápices de tallo y germinación de semillas. (Fig.35 B).

## CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de *Tillandsia erubescens* es una alternativa eficaz de propagación y conservación de la especie que puede ser aplicada a otras especies del género, especialmente a organismos con características ecológicas similares. También constituye un mecanismo que acelera el desarrollo natural lento del género y que permite conservar la diversidad genética en caso de ser propagada por medio de semillas o favorecer caracteres apreciados en caso de realizarse la multiplicación a través de ápices de tallo. La propagación por ápices de tallo es una alternativa de propagación rápida. Para *T. erubescens* el uso de una combinación de auxinas y citocininas equilibrada (0.01mg/l ANA y 0.5mg/l BAP) produjo crecimiento apical y un buen número de brotes laterales.

Las semillas conservada en condiciones ambientales fueron germinadas por tiempo limitado, para *T. erubescens* este tiempo no fue mayor a ocho meses.

**IZT.**

La influencia de la sacarosa a lo largo de la propagación quedó claramente manifiesta y se puede mencionar la acción encontrada:

La sacarosa no influyó en la primera etapa de la germinación (rompimiento de la cubierta seminal) evento que parece estar más relacionado con la longevidad de la semilla y las reservas cercanas al embrión.

La influencia de la sacarosa en el medio de cultivo se hizo evidente después de la semana 12 de cultivo viéndose afectada la supervivencia de las plántulas, el diámetro de las células del mesofilo, el desarrollo histológico de mesofilo, el grosor del parénquima clorofílico, la clorofila en tejido, la formación de epidermis y las escamas tricomas, también se vió afectado el proceso de enraizamiento de plántulas.

La concentración de sacarosa en los tratamientos tuvo un papel importante en los patrones hídricos de los tejidos, los medios de cultivo con concentraciones bajas de sacarosa 0.3% y 0.6% presentaron signos evidentes de hiperhidratación, los medios con concentraciones de 1.5% y 2% tuvieron un aporte de azúcares suficiente que se evidencio en el desarrollo histológico, morfológico y el equilibrio fisiológico de los tejidos.

En relación con uso de reguladores de desarrollo tenemos que la acción sinérgica de auxinas y citocininas ANA y BAP en concentraciones de 0.01mg/l y 0.5mg/l respectivamente causaron en el cultivo de ápices de tallo, buen desarrollo de brote apical





Fig. 21. Plantas adultas (30 cm) de *T. erubescens* var. *erubescens* en floración, cultivadas en el Jardín Botánico de la FES-Iztacala, UNAM.

A



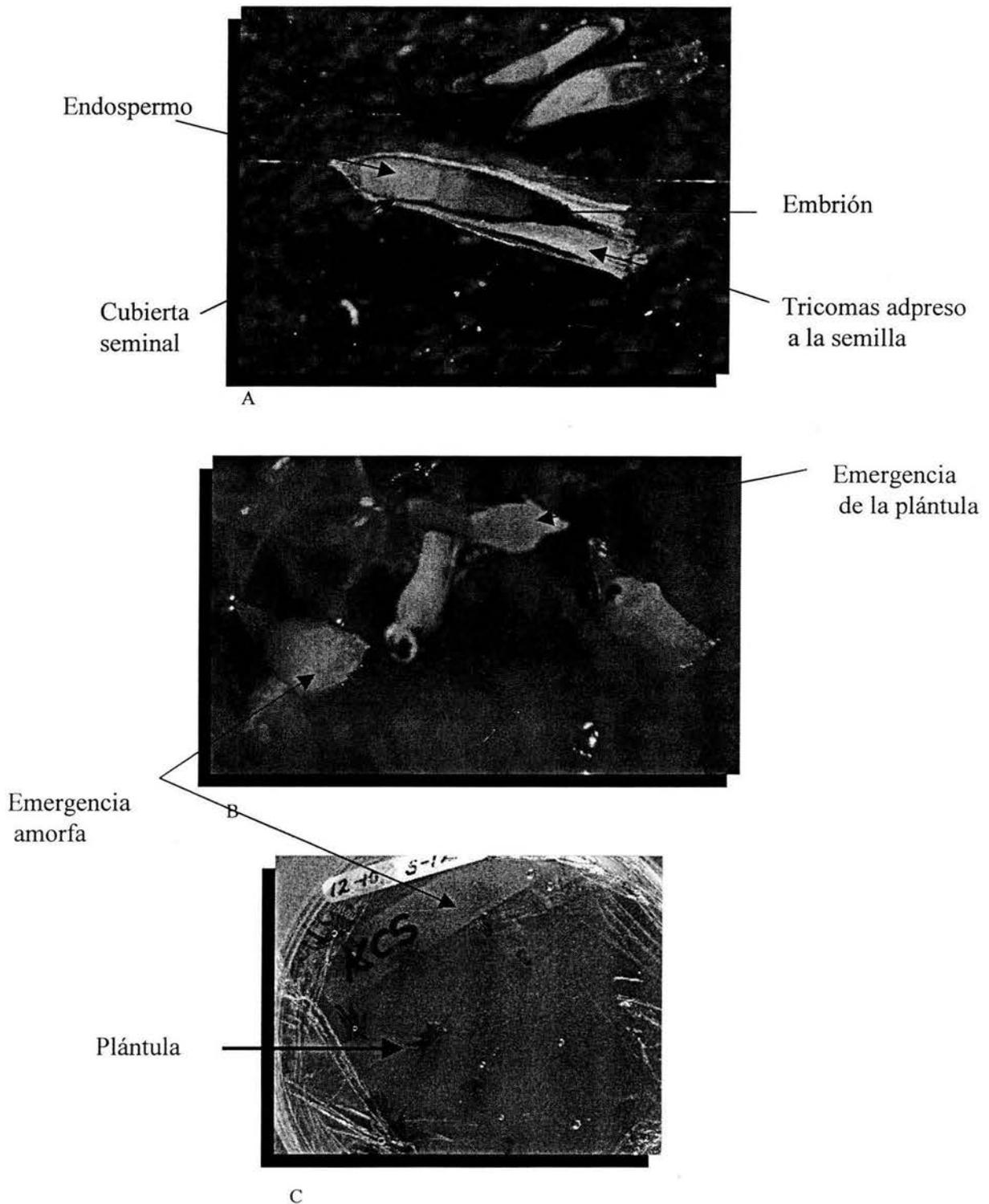
*Tillandsia erubescens* var. *patentibracteata*

B

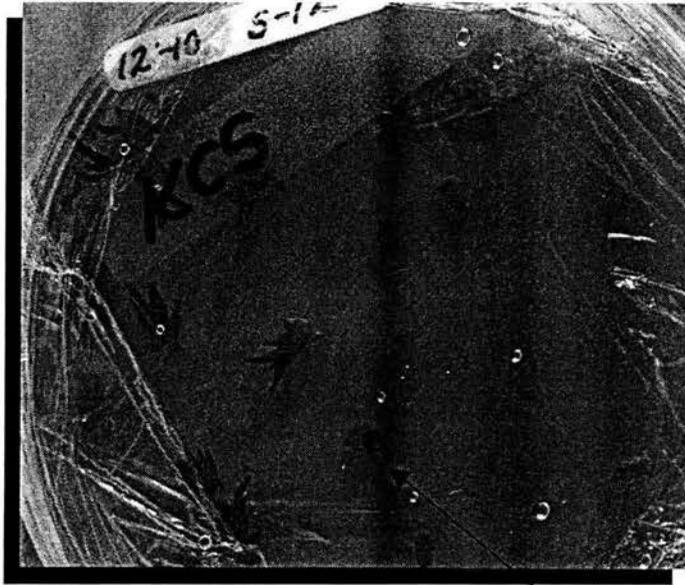


*Tillandsia erubescens* var. *arroyensis*

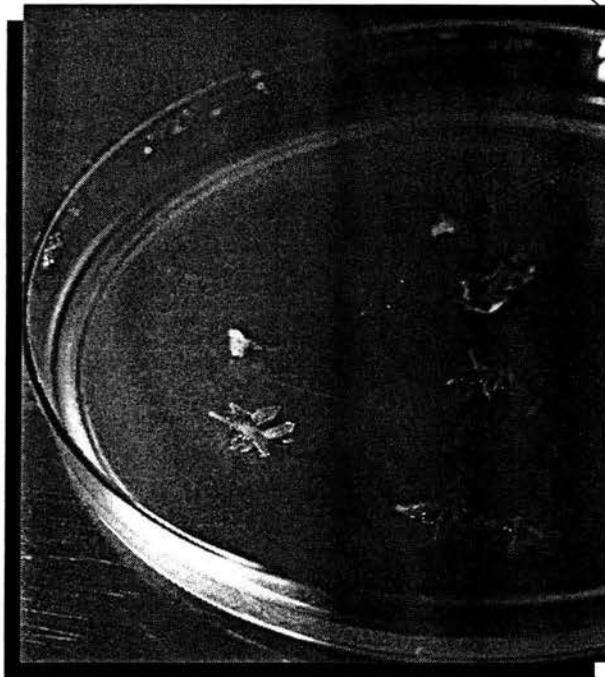
Fig. 22. Fotografías tomadas de Weber (1981)



**Fig. 23. (A)** Embriones de semillas de *T. erubescens* teñidos con TTC; **(B)** Semillas de *T. erubescens* con rompimiento de la cubierta seminal al cuarto día de cultivo; **(C)** plántulas de tratamientos con sacarosa y desarrollos amorfos generados a partir de la germinación de semillas.



A

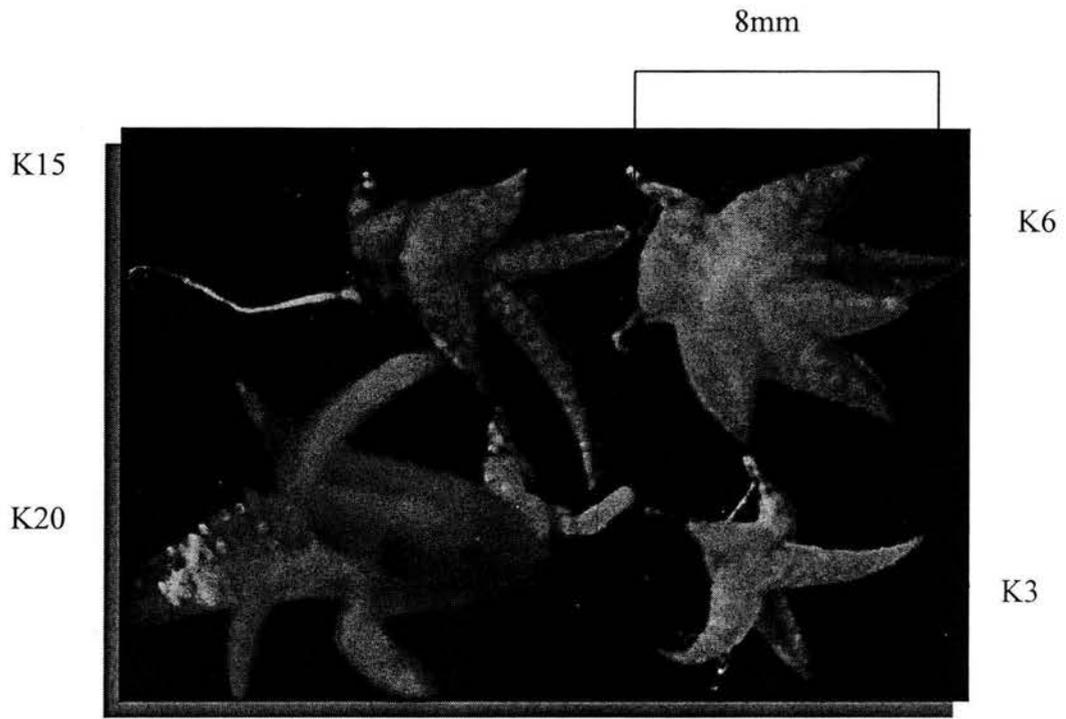


B

Crecimientos  
Amorfos y oxidaciones

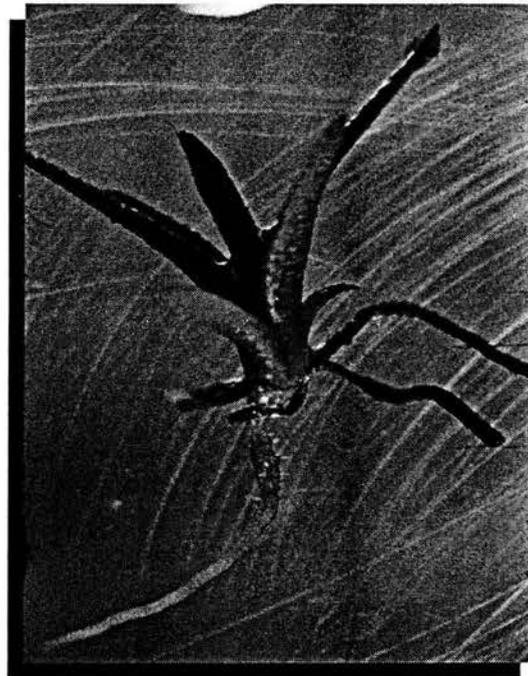
5mm

Fig. 24. (A) Plántulas de *T. erubescens* cultivadas con 2% de sacarosa, obsérvese el mayor tamaño y coloración intensa; (B) Plántulas cultivadas en medio KC sin sacarosa después de ocho semanas, nótese el crecimiento amorfo de algunas semillas.



A

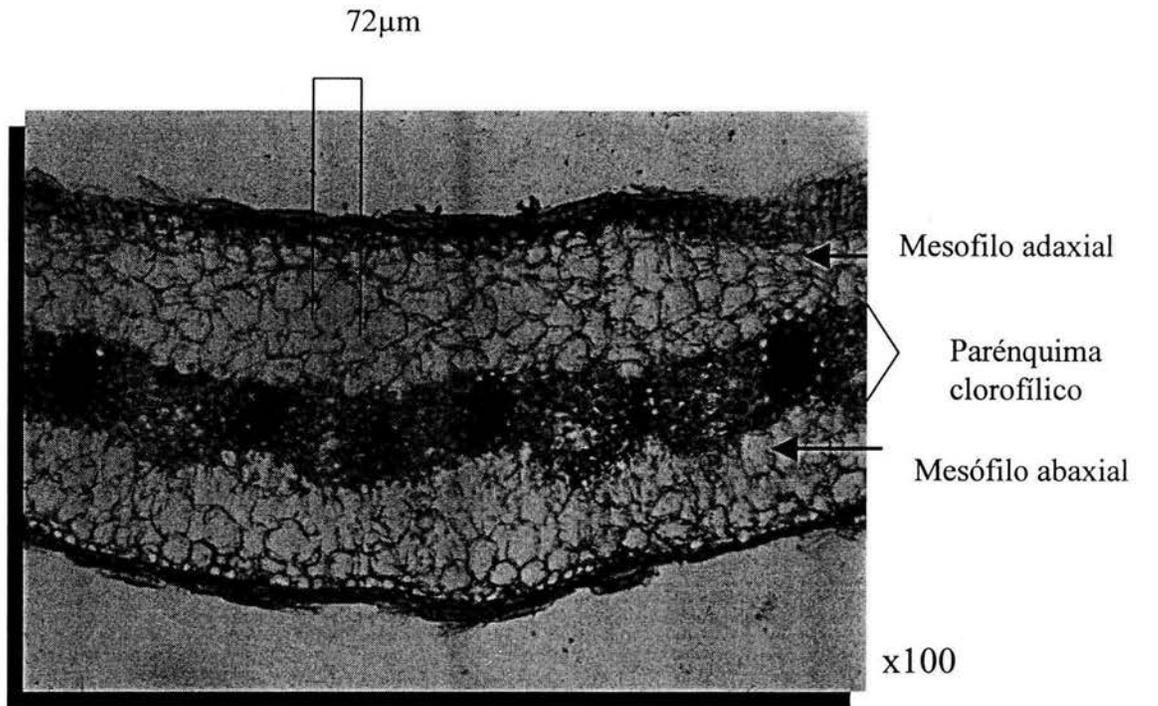
x40



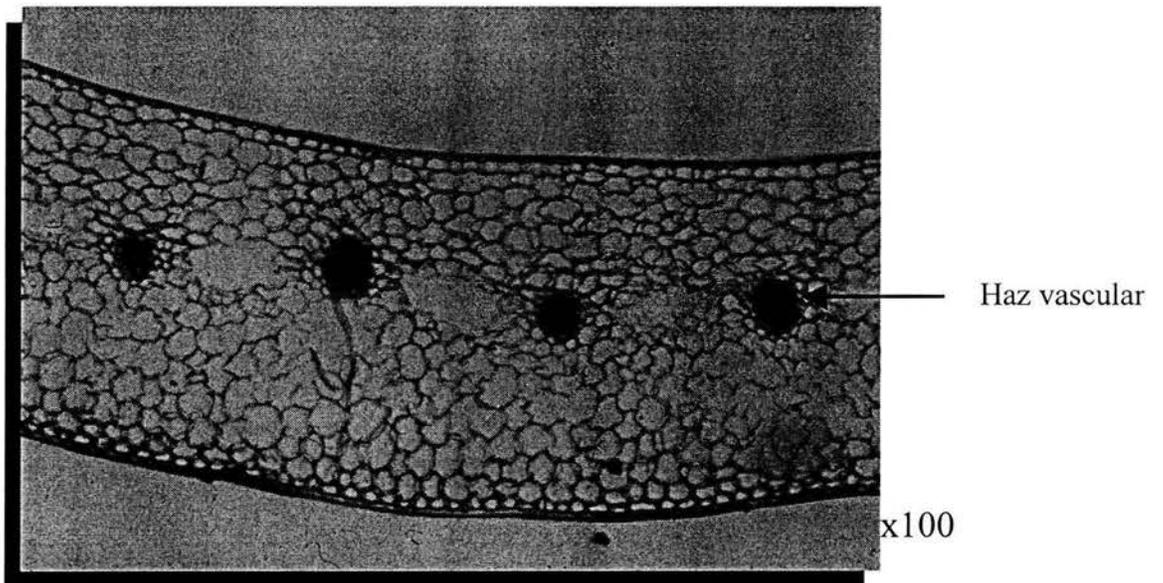
B

x40

Fig. 25. (A) Comparación de plántulas de *T. erubescens* con 12 semanas de desarrollo cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa K3 0.3%, K6 0.6%, K15 1.5% y K20 2%; (B) Enraizamiento de plántula de *T. erubescens* después de 16 semanas de cultivo en medio con 2% de sacarosa.

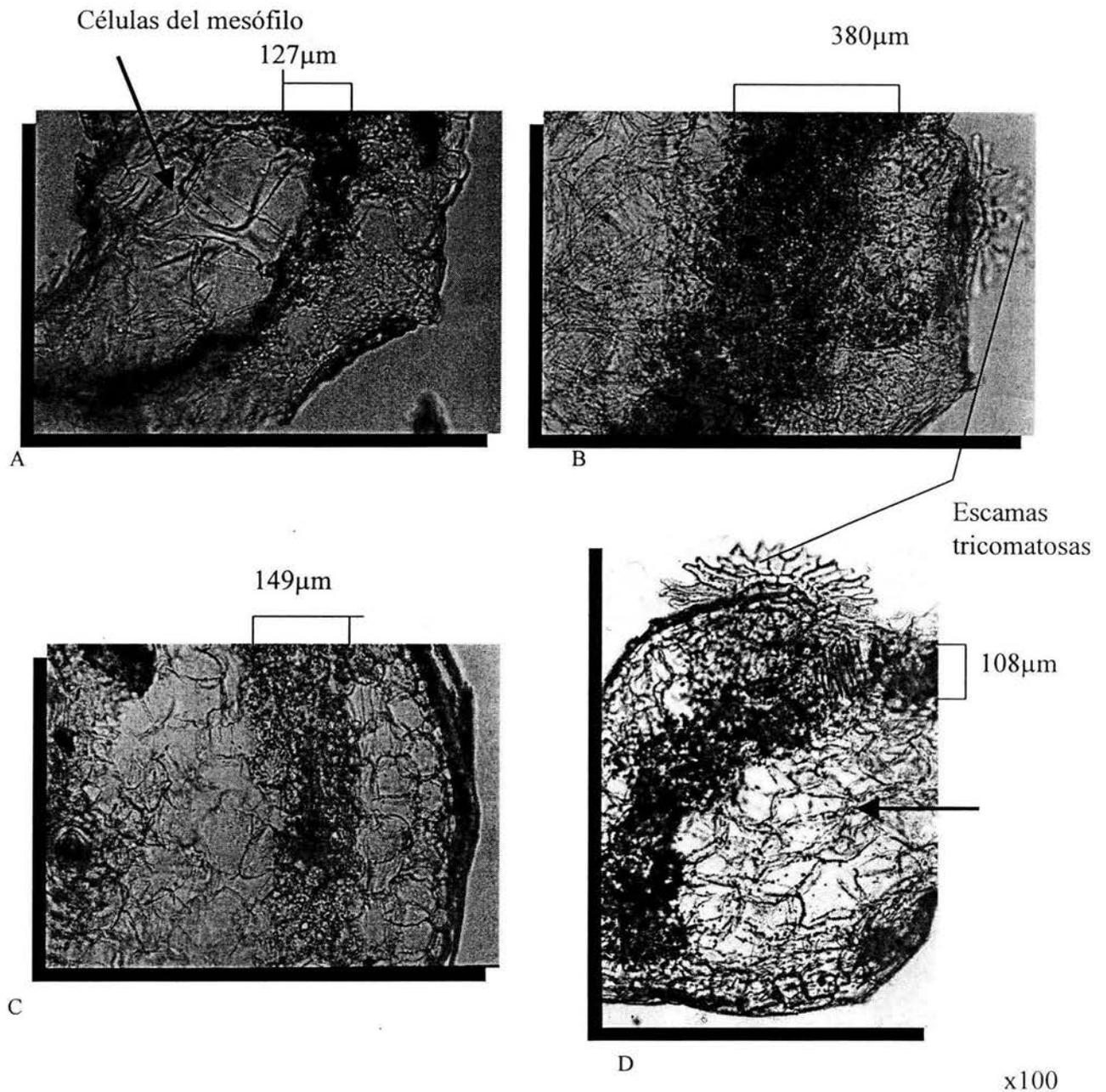


A

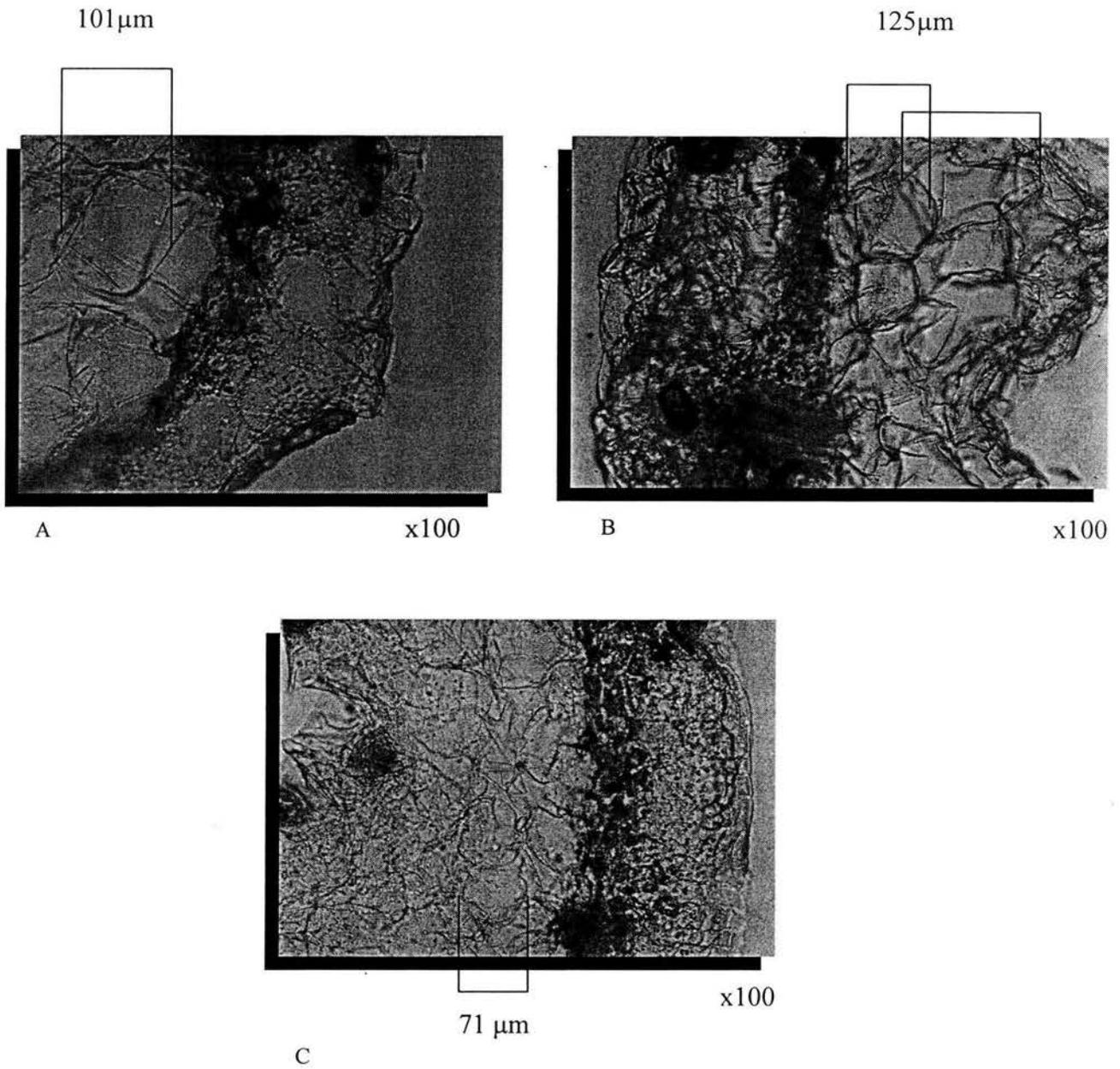


B

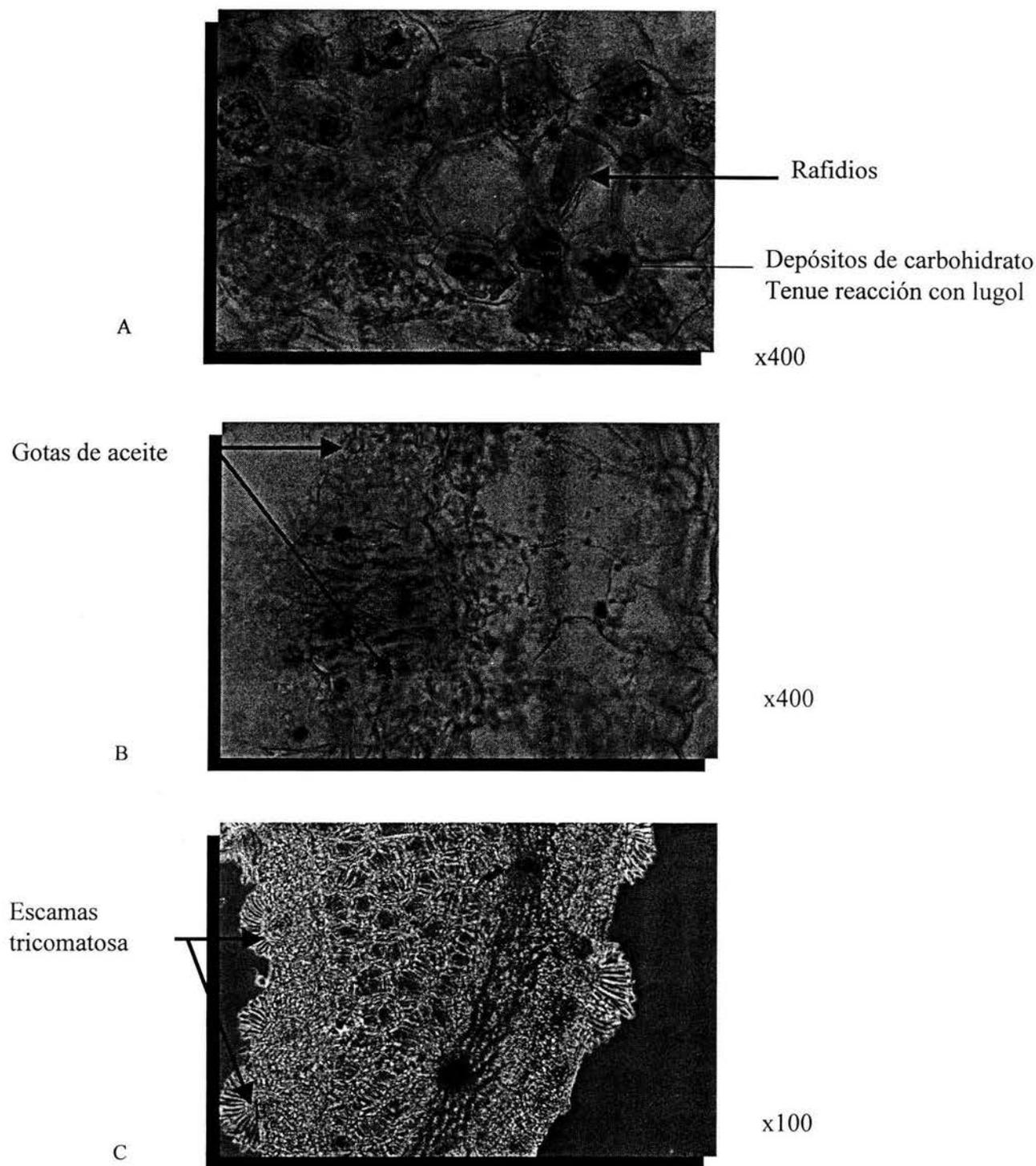
**Fig. 26** Secciones transversales de láminas foliares de plantas silvestres adultas de *T. erubescens* (A) Lámina de hoja teñidas con lugol; (B) Lámina de hoja sin tinción (10X).



**Fig.27. Diferencias histológicas en secciones transversales de la parte media de las láminas foliares de plántulas de *T. erubescens*, cultivadas en diferentes concentraciones de sacarosa. Resultados obtenidos después de doce semanas de desarrollo. (A) tratamiento K3 con parénquima reducido; (B) tratamiento K6 con parénquima disperso y de apariencia amplia; (C) tratamiento K15 parénquima más definido; (D) tratamiento K20 más denso y concentrado a una zona. Obsérvese un mejor desarrollo de las células de la epidermis y escamas tricomatosas en D**



**Fig. 28. Diferencias de diámetros celulares evidentes en secciones transversales de la parte media de las láminas foliares de plántulas de *T. erubescens* cultivadas en tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa. (A) K3; (B) K6; (C) K15.**



**Fig. 29.** Secciones transversales de láminas de hoja de *T. erubescens* (A) Células del parénquima clorofílico teñidas con lugol ; (B) Tinción con Sudan III, Haz vascular con gotas de aceite; (C) Aspecto obtenido después de 25 semanas de cultivo en el tratamiento K20 con ordenamiento histológico más parecido al de las plantas del campo y con buen desarrollo de escamas tricomatosas.

30 días



A

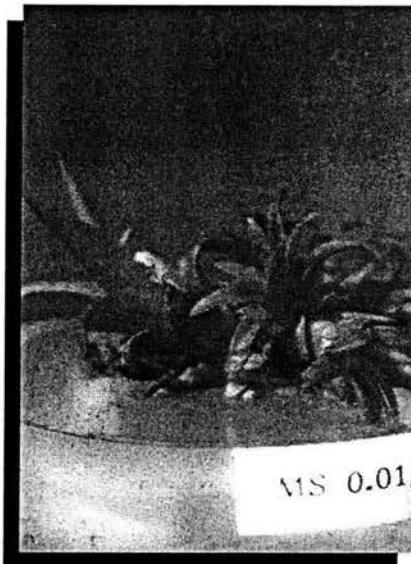


45 días

Brotos laterales

B

60 días



C



90 días

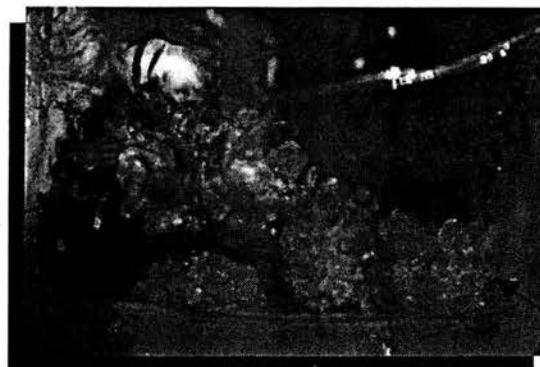
Brotación múltiple

D

E

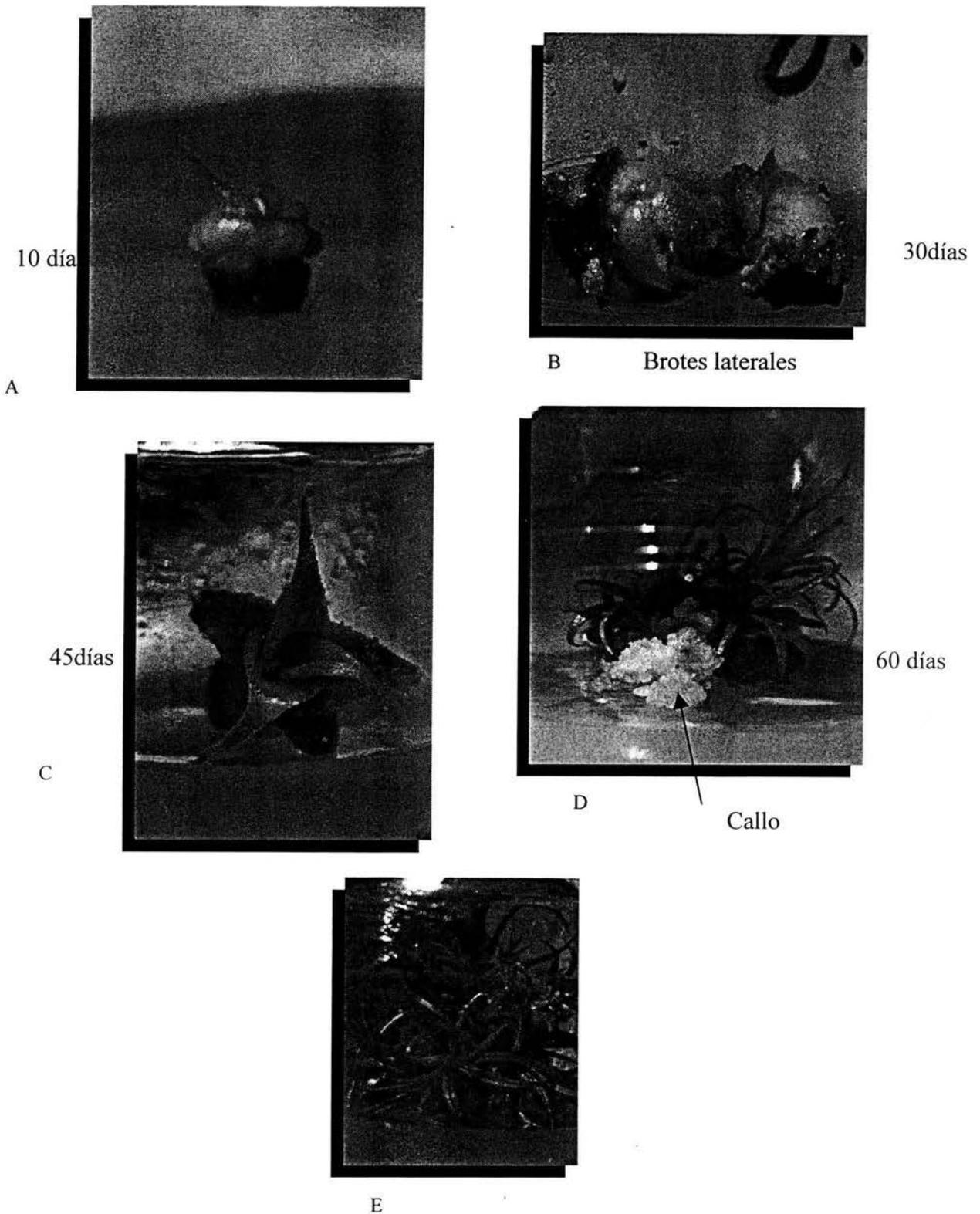
60 días

Hiperhidratación  
Callo duro



Callo friable

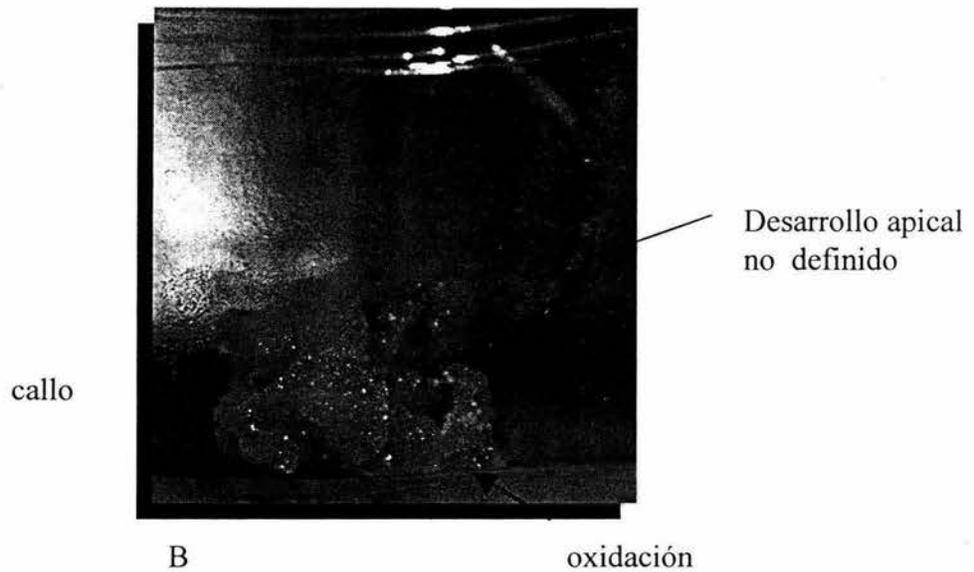
**Fig.30. Plántulas derivadas de ápices de tallo de *T. erubescens* cultivadas en BAP 0.5 y ANA 0.01mg/l (A) Desarrollo del ápice y formación de pequeños brotes laterales; (B) Brote con varias hojas y pequeños brotes laterales; (C) Brote apical y brotes laterales a 60 días de desarrollo; (D) Multiplicación de brotes laterales; (E) Callo duro y friable.**



**Fig.31. Plántulas derivadas de ápices de tallo de *T. erubescens* cultivadas con BAP 0.5 mg/l , ANA 0.01 mg/l (A) Brote apical con 10 días de desarrollo; (B) Formación de Brotes laterales; (C) Brote apical dominante sin brotes laterales; (D) Multiplicación y formación de callo; (E) Multiplicación de brotes laterales**



A



**Fig.32. (A) Multiplicación de brotes laterales de *T. erubescens* en tratamientos con diferentes concentraciones de BAP 1.0 y 0.5 mg/l; (B) cultivo de ápices de tallo con 2 mg de BAP presenta crecimiento apical mal definido callo lateral y oxidación.**



A

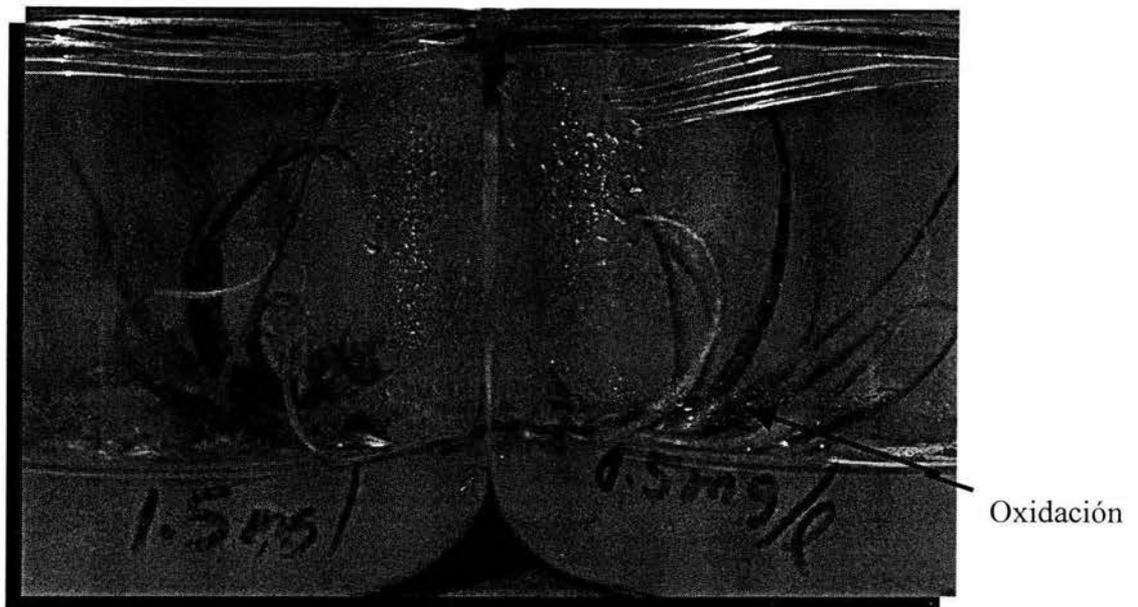
x20



B

x20

**Fig.33. Enraizamiento de plántulas de *T. erubescens* (A) Plántulas de tratamiento K20 mostrando enraizamiento sin reguladores hormonales; (B) Enraizamiento de plántulas subcultivadas en medio con ANA 1 mg/l durante 30 días. Obsérvese que el regulador ANA estimuló el desarrollo de raíces más gruesas y ramificadas.**



A



B

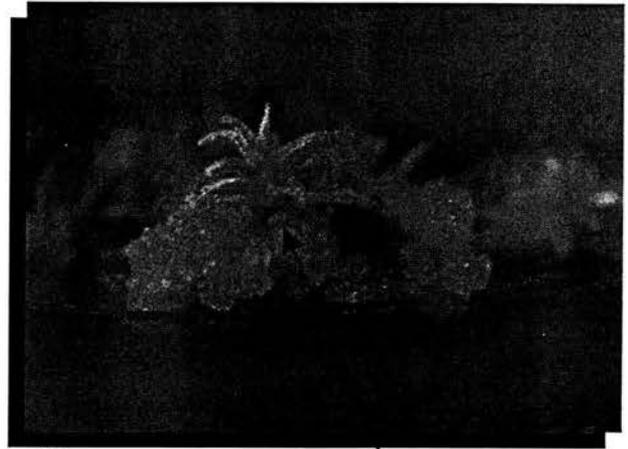
Raíz

Fig. 34. Efecto de reguladores de crecimiento en plántulas de *T. erubescens* derivadas de ápices de tallo. (A) Regulador ANIA en diferentes concentraciones, puede observarse la oxidación y decaimiento general de las plántulas; (B) Regulador IBA, izquierda, comparado con el efecto del regulador ANA, derecha, el cual muestra crecimiento apical mayor y enraizamiento en mayor porcentaje.



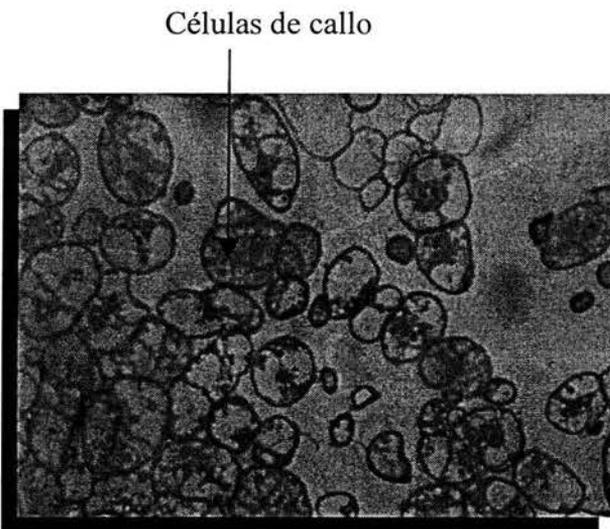
A

Callo



B

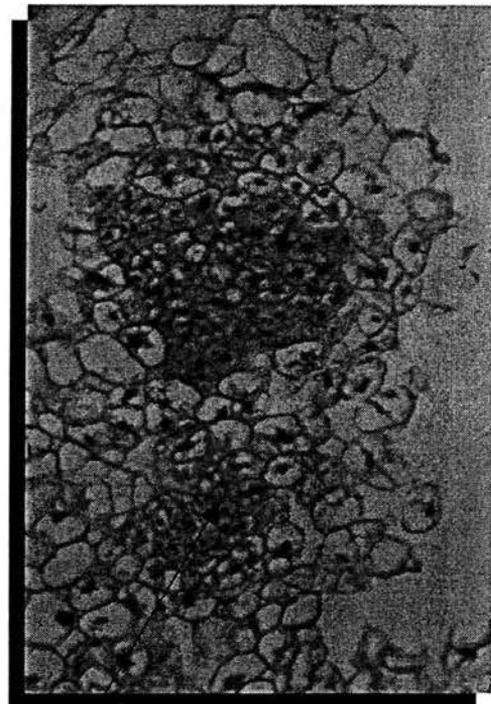
Regeneración de plántulas en callo



Células de callo

C

x400



D

Área de multiplicación celular

x400

**Fig.35. (A) Callo de *T. erubescens* en tratamientos con regulador BAP 0.5 mg/l; (B) Regeneración de plántulas a partir de callo blando; (C) Células de callo cultivado en medio con BAP 0.5 mg/l; (D) Corte de callo cultivado en ANA a 1 mg/l. zonas centrales con mayor división celular.**



Plántula obtenida a partir de semilla,  
de tres años de cultivo.

Plántula obtenida a partir de ápice de  
tallo de 6 meses de cultivo.

**Fig. 36.** Comparación del desarrollo de plántulas cultivadas en K20 de *T. erubescens* obtenidas a partir de la germinación de semillas (izquierda) y a partir de ápices de tallo (derecha).

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, L.E. 1992. Vascular epiphytes of México a preliminary inventory.- *Selvyana*. 13: 75 - 76.
- Arditti, J. y R. Ernst. 1993. *Micropropagation of orchids*, J. Wiley. Nueva York.
- Baber, L. y N.R. Baker. 1985. *Topics in Photosynthesis*. Elsevier. vol. 6.
- Benzing, D.H. 1980. *The Biology of The Bromeliads*. Mad River Press, Eureka, California.
- Benzing, D. H. 1990. *Vascular Epiphytes General Biology and Related Biota*, Cambridge University Press.
- Bessler, B. 1994. Vegetative propagation: treatment with cytokinin BAP brings interesting initial results.- *Journal of the Bromeliad Society*. 44: 247-253
- Bessler, B. 1997. The use of 6-benzylaminopurine for rapid multiplication of tillandsias.- *Hortscience* 32: 256- 258.
- Capellades, M., R. Lemeur y P.C. Debergh. 1990. Kinetics of chlorophyll fluorescence in micropropagated shootlets.- *Photosynthetica*. 24: 190 - 193.
- Capellades, M., R. Lemeur y P.C. Debergh, 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of pn in *Rosa* cultured in vitro.- *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 25: 21 - 26.
- Cardini, C.E., L.F. Leloir y J. Chiriboca. 1995. The biosynthesis of sucrose.- *Journal Biol.Chem.* 214: 149 - 155.
- Coombs, J. 1988. *Técnicas en Fotosíntesis y Bioproductividad*. Futura SA. México.
- Curtis, P.J. 1986. *Microtecnia Vegetal*. Trillas. México. D.F.
- Chatterton, N.J. y John, E. S. 1980. Photosynthate partitioning into leaf starch as affected by daily photosynthetic period duration in six species.- *Physiol. Plant.* 49: 141 -144.

Davis, D.T. y J.R. Potter. 1989. Relation between carbohydrate, water status and adventitious root formation in leafy pea cuttings rooted under various levels of atmospheric CO<sub>2</sub> and relative humidity.- *Physiol Plant.* 77: 185 - 190.

Debergh, P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium.- *Physiol. Plant.* 59: 270 - 276.

Desjardins, Y. 1995. Photosynthesis *in vitro* on the factor regulating CO<sub>2</sub> assimilation in micropropagation systems.- *Acta Horticulturae.* 393: 45 - 61.

Diario Oficial de la Federación. Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. 1994. Tomo CDLXXXVIII No. 10. pp.110.

Dodds, J.H. y L.N. Roberts. 1995. *Experiments in Plants Tissue Culture.* 2a ed. Cambridge University Press, Nueva York.

Dolgov, S.V., T.V. Shushkova y A.P. Firsov. 1998. Pineapple (*Ananas comosus* Mess.) regeneration from leaf explants.- *Acta Horticulturae* 461: 439- 444.

Dubé, S. L. y W. Vidaver. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*.- *Physiol. Plant.* 84: 409 - 416.

Engelmann, F. 1998. *In vitro* germoplasm conservation.- *Acta Horticulturae* 461: 41-47.

Espejo, S. A. y A. R. López Ferrari. 1994. Las Monocotiledóneas Mexicanas. Parte III. CNFM, UAM, CONABIO.

Franklet, A. 1991. Biotechnology in "rejuvenation": hope for the micropropagation of difficult woody plants.- *Acta Horticulturae.* 289: 273 - 282.

Gardner, S. 1982. Tillandsias at christmas in Mexico.- *Journal of the Bromeliad Society.* 32: 17 - 19.

Goldstein, C.S., y J. M. Widholm. 1990. Photosynthetic characterization of photoautotrophic cells cultured in a minimal

medium.- Plant Physiol. 94: 1641 - 1646.

Gourichon, C.G., H, Sallanon. y A, Coudret. 1996. Effect of sucrose, agar, irradiance and CO<sub>2</sub> concentration during the rooting phase on the acclimation of *Rosa hybrida* plantlets to *ex vitro* conditions.- Photosynthetica. 32: 263 - 270.

Grout, B.W.W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stress of transplanting.- Acta Horticulturae. 230: 129 - 135.

Gulsen, Y. y H. Dananoglu. 1991. The effect of sucrose, agar and ph on shoot multiplication and quality in quince a micropropagation.- Acta Horticulturae. 289: 115 -116.

Hipking, M.F.y N.R. Baker. 1986. Photosynthesis Energy Transduction a Practical Approach. Oxford. Inglaterra. p. 63 -65.

Harrison, R.C. y J. Arditti. 1978. Physiological changes during the germination of *Cattleya auriantica* (Orchidiaceae).- Bot Gaz. 139: 180 - 189.

Hoffmann-Thoma, G., K. Hinkel., P. Nicolay. y J. Willenbrink. 1996. Sucrose acumulation in sweet sorghum stem internodes in relation to growth.- Physiol. Plant. 97: 277 - 284.

Hosoki, T. y T. Asahira, 1980 In vitro propagation of bromeliads in liquid culture.- HortScience, 15(5):603-604.

Huidobro, M.S. 1988. El Género *Tillandsia* (Bromeliaceae) en el Estado de México, Tesis. UNAM.

Infante, R., E. Magnanini y B. Righetti. 1989. The role of light and CO<sub>2</sub> in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa in vitro*.- Physiol. Plant. 77: 191 - 195.

Kevers, C., M. Coumans., M.F. Coumans-Gilles y Th. Gaspar. 1984. Physiological and biochemical event leading to vitrification of plant cultured *in vitro*.- Physiol. Plant. 61: 69 - 74.

Kiss, E., J, Kiss., G. Gyulai y L.E. Heszky. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple.- Hortscience 30: 127 -129.

Knudson, L. 1946. A new nutrient solution for germination of orchid

seed. Amer. Orch. Soc. Bull. 15: 214-217.

Kozai, T., Y. Koyama e I. Watanabe. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux.- Acta Horticulturae. 230: 121-127.

Labus-Schneider, F. O. y W. O. Abel. 1991. Regeneration of *Tillandsia* through immature embryo culture.- Acta Horticulturae. 289: 121-122.

Lipavská, H. y L. Nátr. 1991. Change in shoot / root ratio resulting from different sugar and nitrogen nutrition of rape seedling growth *in vitro*.- Acta Horticulturae. 289: 127 - 128.

Luther, H.E. 1994 y 1995. A guide to species of *Tillandsia* regulated by appendix II of CITES.- Journal of the Bromeliad Society. 44: 260-264.

Luther, H.E. 1995. A guide to species of *Tillandsia* regulated by appendix II of CITES.- Journal of the Bromeliad Society. 45 : 21-24.

Luther, H.E. 1995. A guide to species of *Tillandsia* regulated by appendix II of CITES.- Journal of the Bromeliad Society. 45: 65-71.

Mangat, B.S., M. K. Pelekis, y A. C. Cassells. 1990. Changes in the starch content during organogenesis *in vitro* cultured *Begonia rex* stem explants.- Physiol Plant. 79: 267-274.

Mapes, M.O. 1973. Tissue Culture of Bromeliads. Comb. Proc. I.P.P.S. Vol. 23: 46-55.

Mayak, S. y T. Tirosh. 1998. Growth and development of pineapple (*Ananas comosus* L.) plantlets cultured *in vitro* at enriched and ambient CO<sub>2</sub> environments.- Acta Horticulturae 461: 225- 229.

Mercier, H y B.G. Kerbauy. 1994 *In vitro* cultured of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the brazilian atlantic forest. Journal of The Bromeliad Society. 44: 120-124.

Mekers, O. 1977. *In vitro* propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae).- Acta Horticulturae. 78: 311 - 320.

Moncousin, Ch. 1991. Rooting of microcuttings, General Aspect.- Acta

Horticulturae. 289: 301 - 309.

Moncousin, Ch. 1991. Rooting of microcuttings, fundamental aspect, unmanipulated factors.- Acta Horticulturae. 289: 311- 317.

Moncousin, Ch. 1991. Rooting of microcuttings, unmanipulated factors.- Acta Horticulturae. 289: 319 - 327.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473 - 497.

Murashige, T. 1994. Plant propagation through tissue culture.- *Plant Physiol.* 25: 135 - 166.

Nickle, T.C. y E.C. Yeung. 1993. Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *Daucus carota* ( Apiaceae ).- *American Journal of Botany.* 80: 1284 - 1291.

Nowak, E.J. y C. E. Martin. 1995. Effect of elevated CO<sub>2</sub> on nocturnal malate accumulation in cam species *Tillandsia ionantha* and *Crassula arborescens*.- *Photosynthetica* 31: 441 - 444.

Oeser, M.D. 1953 y 1977. Propagation of Tillandsias From Seed.- *Bromeliad a Cultural Hand Book.* The Bromeliad Society Inc, 3<sup>a</sup> ed. Acadia California.

Oeser, M.D. 1991. Easy methods for raising some bromeliads from seed.- *Journal of The Bromeliad Society.* 41(9): 25 - 30.

Padilla, V. 1985. Bromeliads in american horticulture.- *Journal of The Bromeliad Society.* 35: 3 - 8.

Pàques, M. y Ph. Boxus. 1987a. A model to learn "vitrification", apple m26 present result.- *Acta Horticulturae* 212: 193 - 210-

Pàques, M. y Ph. Boxus. 1987b. " Vitrification": review of literature.- *Acta Horticulturae.* 212: 155 - 166.

Pàques, M. y Ph. Boxus. 1987c. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content?.- *Acta Horticulturae* 212: 245 - 252.

Pàques, M. 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects.- *Acta Horticulturae*. 289: 283 - 290.

Pasqualetto, P. L., W.P. Wergin. y R.H. Zimmerman. 1988. Changes in structure and elemental composition of vitrified leaves of " gala" apple *in vitro*.- *Acta Horticulturae*. 227: 352 - 357.

Phillips, R. H. 1980. Growing bromeliads from seed in Fiji.- *Journal of The Bromeliad Society*. 30: 68 -73.

Pierik, R.L.M. y H.H.M. Steegmans,. 1984. Vegetative propagation of *Nidularium fulgens* Lem.- *Netherlands Journal of Agricultural Science* 32: 101 - 106.

Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans y J. Hendriks. 1984. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of *in vitro* cultivated seedlings of Bromeliaceae.- *Scientia Horticulturae* 24: 193-199.

Pierik, R.L.M. y P.A. Sprenkel. 1991 Micropropagation of *Tillandsia cyanea* .- *Journal of The Bromeliad Society* 41: 10-12.

Pippin, D.E. 1984 Raising bromeliad from seed.- *Journal of The Bromeliad Society* 34: 81- 82.

Pollard, J.W. y J.M, Walker. 1990. *Plant Cell and Tissue Culture*. Human press. Nueva Jersey.

Pospisilova, J., J. Solarova y J. Catsky. 1992. Photosynthetic responses to stress during *in vitro* cultivation.- *Photosynthetica*.26: 3- 18.

Rauf, W. 1979. *Bromeliad For Home, Garden and Greenhouse*. For Press. British Bromeliad Society London.

Read, E. P. y E. Szendrák. 1998. Micropropagation and biotechnology of tropical and subtropical ornamental.- *Acta Horticulturae* 46: 93 - 103.

Redway, F. A. 1991. Histology and stereological analysis of shoot formation in leaf callus of *Saintpaulia ionantha*. Wendl. (African Violet).- *Plant Science*. 73: 243 - 251.

Reinert, J. y M.N. Yeoman. 1982. *Plant and Cell Tissue Culture*, A

Laboratory Manual. Springer >Veriang. Berlin.

Roger, S.E. 1984. Micropropagation of *Tillandsia dyeriana*.- Journal of The Bromeliad Society. 34: 111- 112.

Roth, I. 1964. Microtécnica Vegetal. Fac. Ciencias. Universidad Central de Venezuela Caracas, Venezuela.

Sydney, G. 2000. Vegetative propagation in Bromeliaceae.- Journal of The Bromeliad Society. 50: 10 -13.

Sloan, M. 1992. Tillandsias out on a limb.- American Horticulturist. 71: 30 - 35.

Singh, A.K. y R.S. Duvey. 1995. Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystem 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCl.- Photosynthetica. 31: 489 -499.

Smith L.B. y R.J. Downs, 1974 Flora Neotropica. Nueva York, Collier Mcmillan. (Monografía No. 14 - 1) Bromelioideae (Bromeliaceae) pp.663- 1666.

\_\_\_\_\_. 1977. Flora Neotropica. Nueva York, Collier Mcmillan (Monografía No 14- 2) Tillandsioideae (Bromeliaceae) pp 1492

Taylorson, B.R. 1989. Recents Advances in The Development and Germination of Seeds. Nato, Life Sciences, V. 187. Nueva York.

Thorpe, T.A., R. W. Joy IV. y D. W. M. Leung. 1986. Starch turnover in shoot forming tobacco callus.- Physiol Plant. 66: 58 - 62.

Thomson, P.A. 1977. Orchid From Seed. Royal Botanic Garden Kew Londres. 24- 29.

Van Huylenbroeck, M. L. y J. De Riek. 1995. Sugar and starch metabolism during ex vitro rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets.- Plant Science 111: 19- 25.

Van Huylenbroeck, J.M. y P. C. Debergh. 1996. Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets.- Physiol. Plant. 96: 298 - 304.

Van Waes, J.M. y P.C. Debergh. 1986. Adaptation of the tetrazolium meted for testing the seed viability, and scanning electron microscopy study of soma western european orchids.- *Physiol. Plant.* 66: 435 - 442.

Vardarajan, G.S., U. Vardarajan y R.C. Locy. 1993. Application of tissue cultured techniques to maintain a rare species, *Puya tuberosa*.- *Journal of The Bromeliad Society.* 43: 112- 117.

Vieitez, A.M., A. Ballester., M.C. San José y E. Vieitez. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified schoots of chetnut regenerated *in vitro*.- *Physiol. Plant.* 65: 177- 184.

Weber, W. 1981. Herbarius Study No.1 The riddle of *Tillandsia erubescens*, Schldt Had end Solved. *Journal of the Bromeliad Society* 33: 173- 175.

Weber, W. 1983. New tillandsias from mexico.- *Journal of The Bromeliad Society* 33: 31 -33.

Williams, B. e I. Huges. 1990. Growing Bromeliads. A & C Black London. Funken Press. Portland Oregon.

Zepeda,C., y Y. Sagawa. 1981. *In vitro* propagation of pineapple.- *HortScience* 16: 495.

Zimmer, K.. y W. Pieper. 1976. Methods and problems of clonal propagation of bromeliad *in vitro*.- *Acta Horticulturae* 64: 25- 29.

Zimmer, K., B. Bebler. Y D. Velt. 1993. Vegetative propagation of atmospheric tillandsias II. *in vitro* propagation.- *Gaterbauwissenschaft.* 58: 164 - 169.

Zimmer, K., B. Bebler y D. Velt. 1993. Vegetative propagation of atmospheric tillandsias III. changes in acidity of the medium during *in vitro* propagation.- *Garterbauwissenschaft.* 58: 225 - 227.

Zirimburegama, K. y L.PJ. Wijesinghe. 1992. *In vitro* growth of *Ananas comosus* L. Merr (Pineapple) shoot apices on different media.- *Acta Horticulturae* 319: 203- 208.