



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

Propagación *in-vitro* de *Tillandsia caput-medusae* E. Morren., y su multiplicación mediante diferentes concentraciones del regulador BAP.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TIULO DE  
B I Ó L O G O  
P R E S E N T A  
**Jonás Millán Castañeda**



Jonás-Millán-Castañeda  
No. Cuenta: 303524179  
Directora: M. en C. María-Elena-Huidobro-Salas



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Agradecimientos y Dedicatoria**

Agradezco ante todo a la Mtra. María Elena Huidobro Salas y al Dr. José Luis Gama Flores por su amistad, por guiarme a lo largo del presente trabajo y dedicar parte de su tiempo y conocimientos.

Agradezco y dedico este trabajo a mis padres por el apoyo que me han dado, la confianza que depositaron en mis decisiones, las perspectivas distintas que me facilitaron durante mi formación académica y como persona, así como también al cariño y paciencia que me han tenido. Agradezco a mis hermanos ya que siempre conté con su afecto, ayuda, confianza y enseñanzas. Agradezco a mis amigos por la hermandad que hemos construido, ya que por ello hemos podido superar las dificultades que se nos han presentado.

Final mente y de forma particular agradezco y dedico la culminación de mi trabajo de tesis a la persona más importante para el resto de mi vida. **Alejandra G. M.**

# Glosario

- ∞ Introducción
  - ☞ Generalidades de la familia *Bromeliaceae*.
    - Clasificación taxonómica.
  - ☞ Características de tillandsias.
    - Clasificación por hábito.
  - ☞ Importancia y uso de tillandsias.
    - Ecológico
    - Social
    - Económico
    - Científico
  - ☞ Reproducción en tillandsias.
  - ☞ Problemática y estrategias de conservación en tillandsias.
  - ☞ Uso de reguladores de crecimiento en la propagación
  - ☞ *Tillandsia caput-medusae*.
  - ☞ Justificación
- ∞ Objetivos.
  - ☞ General
  - ☞ Específicos
- ∞ Diseño experimental
  - ☞ Primera etapa
    - Viabilidad
    - Germinación
  - ☞ Segunda etapa
    - Multiplicación vegetativa
- ∞ Resultados
  - ☞ Primera etapa
    - Viabilidad
    - Germinación
  - ☞ Segunda etapa
    - Multiplicación
    - Formación de callos
    - Sintomatologías asociadas
    - Descripción de las capas
    - Tamaños celulares
    - Oxidación
- ∞ Discusión
  - ☞ Viabilidad
  - ☞ Germinación
  - ☞ Multiplicación
- ∞ Conclusiones
  - ☞ Viabilidad
  - ☞ Germinación
  - ☞ Multiplicación
- ∞ Bibliografía

## ∞ Introducción.

### ∞ Generalidades de bromelias

La familia *Bromeliaceae* presenta plantas herbáceas, de tipo terrestres, litófalas o epifíticas con metabolismo CAM. De manera general presentan de tallos cortos erectos laminas en forma arrosetada, de la cual surgen regularmente en la zona central las inflorescencias, que como característica son flores perfectas fuertemente coloreadas, dispuestas en inflorescencias, pudiendo ser espigas, racimos o panículas, ubicadas apicalmente o en las axilas de hojas. El fruto puede ser tipo baya o cápsula, las semillas son pequeñas, de testa lisa o carnosa, en *Tillandsia* provistas de ala aérea (Smith 1974, Ceja 2008, Véliz 2010 y Mondragón 2011)

Las bromelias se consideran originarias del continente Americano y tienen amplia distribución en el mismo, desde el sur de los Estados Unidos hasta la tierra de fuego en Argentina (Mapa 1), con excepción de una especie que es africana. Entre todas las categorías suman un total de 3086 especies, poseen representantes en una amplia gama de ecosistemas (Smith 1974, Véliz 2010 y Mondragón 2011)



Mapa 1. Distribución de la familia Bromeliaceae

Para México están reportadas 363 especies, con la mayoría pertenecientes al género *Tillandsia* y el resto se encuentran distribuidos dentro de 17 géneros más. Es importante mencionar que las especies mexicanas presentan un endemismo del 70%, destacando en ello los géneros *Tillandsia* subgénero *Tillandsia*, *Hechtia* y *Pitcairnia* (Ceja 2008 y Mondragón 2011)

Morfológicamente poseen una gama diversa de formas, las cuales presentan función en el proceso de adquisición de nutrientes y agua, algunas forman un tanque o pseudotanque central mientras que otras forman pseudobulbos constituido por la parte basal de las láminas foliares (Smith 1974, Ceja 2008, Véliz 2010 y Mondragón 2011).

En ocasiones se les denomina fitotelmata, por las relaciones que establecen con grupos animales principal mente artrópodos. Estas relaciones se derivan de la morfología de laminas foliares, en casi todos los casos presentan recubrimientos foliares constituidos de tricomas que dan a las plantas una apariencia grisácea brillante. Cabe mencionar que México se considera un posible centro de distribución de las *Tillandsias*. (Gardner. 1986 y Burt & Utley 1987).

### ☞ **Clasificación taxonómica**

La sistemática de la familia Bromeliaceae dadas las características del fruto, semillas, láminas foliares, pétalos y la posición del ovario, según Smith 1974, Ceja 2008, Véliz 2010 y Mondragón 2011 se dividen en tres subfamilias:

- I) *Tillandsioideae*. Alberga plantas mayormente epífitas con margen foliar entero, ovario súpero, fruto capsular y semillas con un coma de pelos.  
Esta subfamilia se divide en: Catopsis, Glomeropitcairnia, Guamania, Mezobromelia, Tillandsia, Vriesea.
- II) *Bromelioideae*. Está representada por miembros tanto terrestres como epífitos, con margen foliar serrado, ovario ínfero, fruto tipo baya y semillas desnudas.  
Esta subfamilia se divide en: Acanthostachys, Aechmea, Ananas, Andrea, Androlepsis, Areaecoccus, Billbergia, Bromelia, Canistrum, Cryptanthus, Fascicularia, Fernseea, Gravisia, Greigia, Hohenbergia, Hohenbergiopsis, Neoglaziovia, Neoregelia, Nidularium, Ochagavia, Orthophytum, Portea, Pseudananas, Quesnelia, Ronnbergia, Streptocalyx y Wittrockia.
- III) *Pitcairnioideae*. Generalmente terrestres, con márgenes foliares serrados, flores con ovario súpero, fruto capsular y semillas desnudas o con un ala poco desarrollada.  
Esta sub familia se divide en: Abromeitiella, Ayensua, Brocchinia, Connelia, Cottendorfia,

Deuterocohnia, Dyckia, Encholirium, Fosterella, Hechtia, Navia, Pitcairnia y Puya.

### ❧ Características en Tillandsias.

Las Tillandsias son plantas que se nutren por las hojas. Sus requerimientos de agua y nutrientes son bajos. Todas sus necesidades las obtienen literalmente del aire. Las hojas, en algunos casos suculentas o semisuculentas están cubiertas por tricomas, unas células adaptadas que les permiten absorber agua y nutrientes. Las raíces no tienen capacidad de absorción, sólo les sirven para fijarse a un soporte. Las inflorescencias, particularmente las brácteas, se visten de colores más vivos (Smith *et al.* 1974, Ceja *et al.* 2008, Véliz 2010 y Mondragón *et al.* 2011).

Tillandsia tiene especies en la mayoría de la extensión geográfica del continente americano. Existen especies de hojas angostas y grises, color debido a las escamas que la recubren (Smith *et al.* 1974, Ceja 2008, Véliz 2010 y Mondragón 2011), p.ej. *Tillandsia tectorum*, *aurea*, *aureo-brunnea*, *paleacea*, *straminea*, *capillaris*, *recurvata* y *caput-medusae*. Mientras que otras Tillandsias cuentan con hojas anchas y poco escamosas, las que se juntan unas a otras, formando tanques. (Smith 1974, Gardner. 1986, Burt & Utley 1987, Ceja *et al.* 2008, Véliz 2010 y Mondragón 2011) p.ej. *Tillandsia rubra*, *Wangerini*, *fuscoguttata*, *Schimperiana*, *complanata*, *maculata*, *tetrantha*.

- **Clasificación por hábito**

Esta clasificación no taxonómica que es recurrentemente utilizada, está basada en el medio o sitio donde se desarrollan los organismos (esta clasificación no es exclusiva para las bromelias tillandsias o Pitcarnias) de tal modo que se les clasifica como:

A) Desarrollo terrestre.

A los individuos que crecen sobre el suelo. Los mecanismos radiculares de estos organismos cumplen con las funciones de adquisición de sustancias nutritivas, soporte y adsorción de agua de una forma eficiente.

B) Desarrollo litófilo.

Individuos que se desarrollan en superficies rocosas (en ausencia o proporción mínima de suelo). Los mecanismos radiculares son parcialmente funcionales con respecto a los organismos terrestres.

C) Desarrollo epifítico.

Organismos que se desarrollan sobre un huésped (forofito) al cual no afectan por mecanismos radiculares ni de otro tipo que penetren en la corteza (No parasitan). Dentro de este grupo de individuos la adquisición de nutrientes se separa por características morfológicas en dos grupos:

### Tanque.



Foto 1. *T. Grandis*

Individuos en forma de copa. Estos poseen láminas alargadas ligeramente curvadas y generalmente anchas, las cuales se agrupan por la base formando depósitos que les permiten almacenar agua y materia orgánica de la cual se nutren (Foto 1).

### Pseudobulbo.



Foto 2. *T. caput-m.*

Estas plantas poseen laminas foliares con la porción apical estrecha con respecto a la basal, la cual es cóncava. El desarrollo de las láminas en disposición de roseta da la formación del pseudobulbo por la adición de cavidades en la parte inferior de las plantas (Foto 2).

Ambas morfologías les permiten ser organismos Fitotelmata, formando en sus interiores complejos micro ecosistemas. En el caso de las de tanque es efecto de la capacidad de mantener reservas de agua expuestas al medio, mientras que en las de pseudobulbos la disposición de las láminas funciona como refugio, dando lugar al desarrollo de comunidades de insectos y arácnidos (Murillo 1983, Frank *et al.* 2004, Ospina *et al.* 2004, Franco 2008, Ospina *et al.* 2008, Aguilera 2011 y Frank *et al.* 2009).

## 🌀 **Importancia y usos de Tillandsias**

- **Ecológico.**

Las tillandsias en los Bosques mesofilos de montaña también llamados bosques húmedos de montaña puede llegar a almacenar el 40% de los nutrimentos, de lo cual en conjunto con su época de floración representan una importante fuente de alimento para algunas especies de aves, murciélagos e insectos (Ceja *et al.* 2008, Villaseñor 2010 Y CONABIO 2010).

Tal como señalan diversos trabajos, existe una amplia gama de organismos que dependen de las Bromelias para establecer comunidades, otros requieren de pasar parte de su desarrollo en ellas para completar sus ciclos y algunos otros utilizan partes de las plantas con distintos fines. Sin embargo debemos de considerar tal como señalan (Murillo *et al.* 1983, Aguilera *et al.* 2011, \*<sub>1,2</sub> Frank *et al.* 2004, Ospina *et al.* 2004, Ospina *et al.* 2008, Srivastava 2008, Frank *et al.* 2009), regularmente se forman importantes microecosistemas por la interacción de los organismos asociados a los tanques o pseudobulbos y las condiciones que proveen las plantas. Un claro ejemplo de ello son las interacciones de mimercofilia que se presentan entre las tillandsias y diversos grupos de artrópodos (principal mente Hormigas y otros artrópodos) (Murillo *et al.* 1983, Frank *et al.* 2004, Ospina *et al.* 2004, Franco *et al.* 2008, Ospina *et al.* 2008 y Aguilera *et al.* 2011), con los cuales tienen un gran número de relaciones simbióticas. La morfología de las bromelias puede influir en la comunidad de invertebrados al modificar las variables microclimáticas y los recursos importantes para las comunidades (el detritus, contenido de agua y

espacio disponible para la colonización). (Ospina *et al.* 2004, Franco *et al.* 2008 y Aguilera *et al.* 2011)

- Social

Los grupos humanos comenzaron hace miles de años a utilizar las bromelias con fines alimenticios, medicinales, como combustible, para obtención de fibra para vestimenta y con fines ceremoniales en toda latinoamérica. Principalmente en la antigüedad fueron usadas por las civilizaciones Inca, Azteca y Maya (Mondragón *et al.* 2011 y Hornung 1998, 2000 y 2011)

- Económico

También se les explota con fines comerciales como plantas de ornato ya que la gama de formas y lo vistoso de las flores las vuelve atractivas para su comercio. Hoy en día la mayoría de los ejemplares que se comercian son de procedencia silvestre. También existen algunas que se propagan exclusivamente para su venta, pero los productores presentan la problemática de producciones bajas para la demanda en el mercado internacional ya que las técnicas más utilizadas cuentan con limitantes en el número máximo de organismos que se pueden producir. Dentro de las limitantes tenemos la reproducción vegetativa *in-vivo*, la cual presentan una tasa de aproximadamente tres brotes por planta adulta, o la reproducción sexual, que a pesar de ser efectiva, requiere al menos cinco años para que los individuos sean activos reproductivamente. Dentro de las listas de especies con mayor demanda encontramos a *T. Caput-medusae*, por ser organismos vistosos (Véliz 2010, Mondragón *et al.* 2011 y Hornung 2011).

- Científico

Se les ha dado aplicaciones en el campo de la ciencia, principal mente en la evaluación de la calidad ambiental. Son utilizadas como biomonitores para el registro de contaminantes en al aire (aprovechando la capacidad de tomar los nutrientes y agua del aire que les rodea mediante los tricomas). En esta área destacan valiosos estudios como los realizados por Brighigna *et al.* quienes en 1997 realizaron el biomonitoreo de metales pesados con *T. caput medusae* en Costa Rica; posterior mente en el 2000 reportan la relación entre los contaminantes del aire y la composición de la micro flora que se encuentra en las *T. caput medusae* y *T. shiedeana*, y en el 2002 reportan el uso de *T. caput medusae* y *T. bulbosa* para el monitoreo de metales pesados en Florencia Italia. En el mismo año reportan Amado *et al.* la evaluación de *T. Usneoides* para el biomonitoreo de Hg. En el 2006 reporta Wannaz *et al.* el uso de *T. capillaris* para el seguimiento de las emisiones de metales pesados en Córdoba, Argentina. Posterior mente reportaron Figuerido *et al.* en el 2007 el biomonitoreo de metales pesados con *T. Usneoides* en la zona metropolitana de Sao Paulo Brasil. En el 2009 es reportado por de Berdegal *et al.* el uso de *Tillandsia capillaris* en el biomonitoreo de contaminantes en Lima Perú. También tenemos el trabajo realizado en el 2011 por Trujillo *et al.*, ellos emplearon a *T. usneoides* y *T. recurvata* para el biomonitoreo de la zona de Zimapan, México.

Desde otra perspectiva tenemos el trabajo de Triana *et al.* quienes en el 2003 las emplearon como indicadores de regeneración en bosques intervenidos al analizar la diversidad y abundancia de las epifitas que se desarrollan en la amazonia colombiana

## ☞ Reproducción en Tillandsias

Reproducción en el grupo de las Tillandsias por vía sexual es típica, por semillas (foto 3). Mientras que la forma de reproducción asexual es mediante el desarrollo de brotes laterales (foto 4) (Smith 1976).

Las semillas:



Foto 3. Semillas

Miden menos de 5 mm, poseen embrión, endospermo, un cotiledón, vestigios de hojas primarias y secundarias, ápice del brote, e hipocotilo. El embrión llena sólo un tercio del volumen total y siempre ocupa la posición opuesta al punto de inserción de la pared del ovario. Una vez maduras las semillas, son liberadas de la cápsula que las contiene durante su génesis (dehiscencia) y se dispersan por medio del aire (dispersión anemócora) gracias al apéndice epidérmico plumoso. El apéndice también funciona como “adherente” a los troncos y ramas de los árboles, además de ello permite la absorción de agua (Smith *et al* 1976, Molina 1999, Sosa 2012 y Vázquez *et al* 2014).

Los brotes:



Foto 4. Brotes laterales

Se presentan general mente una vez que inicia el proceso de formación de flores, surgen en la zona axial de las láminas foliares laterales. El número de brotes que pueden presentarse por planta es variable dependiendo de la especie con que se trabaje (Molina 1999 y Vázquez *et al*. 2014).

## ☞ Problemática y estrategias de conservación en Tillandsias

De acuerdo a lo reportado por Mondragón *et al.* (2011), “son muy pocas las especies mexicanas de bromelias que se conservan en bancos de germoplasma” (podría deberse al corto periodo de viabilidad). El cultivo se señala en distintos manuales como relativamente fácil por la vasta cantidad de semillas que producen en cada capsula (Anthura 2012), además de poseer la capacidad de producir hijuelos. Estos recursos reproductivos y los detalles vistosos que presentan en su fenología, las vuelve atractivas para la comercialización como plantas de ornato (Véliz 2010). Según lo reportado por Miranda *et al.* (2007), ha aumentado el comercio de ese tipo de plantas de forma considerable con respecto a otras plantas de ornato.

Una técnica que presenta buenos resultados en la inducción del desarrollo para organismos vegetales de la familia de las bromelias es el cultivo *in-vitro* (Pardo et-al 2008). Continuamente con bases en ello se han generado modificaciones de los medios en cuanto a la composición y a las concentraciones de los compuestos que conforman a cada medio de cultivo a utilizar, por lo cual se han generado para la micropropagación, medios específicos para diferentes tipos de cultivo y dependiendo de la especie a trabajar (Roca *et al.* 1991, Levitus *et al.* 2010).

El éxito de la técnica es el empleo de diversas formulas para la propagación vegetativa en medios de cultivo *in-vitro*. Los cuales tienen como característica que el desarrollo del cultivo sea en el interior de un contenedor el cual proporciona un ambiente artificial controlado tanto en asepsia como en los

factores físicos y químicos que intervienen en el crecimiento de los individuos (Roca *et al.* 1991, Weaver *et al.* 1976).

Existen diversas formas de clasificar los cultivos de tejidos. Tomando en cuenta la consistencia del medio que se emplea, se dividen en dos grupos: a) Cultivo en medio semi sólido y b) Cultivo en medios líquidos. También se pueden clasificar identificando el nivel de complejidad en: a) cultivo de órganos, b) cultivos celulares y C) Cultivos de protoplastos. (Roca *et al.* 1991, Mancilla 2007 y Levitus *et al.* 2010)

En los cultivos de tejidos se puede provocar una rediferenciación hasta producir individuos completos a partir de explantes. A esto se le denomina organogénesis. (Roca *et al.* 1991, Luciani *et al.* 2010 y Levitus *et al.* 2010)

### **☞ Uso de reguladores de crecimiento en la propagación**

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos sintetizados naturalmente, en zonas específicas de las plantas, estas sustancias son capaces de traslocarse a otros sitios de la planta para poder actuar (Roca *et al.* 1991, Luciani *et al.* 2010 y Levitus *et al.* 2010). Se requieren concentraciones muy bajas para causar respuestas fisiológicas específicas (Roca *et al.* 1991). Las concentraciones requeridas para que las plantas expresen respuestas varían con la especie, con el órgano que se estudie, el estado de desarrollo en que se encuentre la planta, las interacciones que se dan entre los diversos reguladores y los factores ambientales. Por lo cual es incorrecto generalizar los efectos que desencadenan estos en los procesos vegetativos. Los reguladores de

crecimiento se clasifican en tres grupos: Auxinas, Citocininas y Giberelinas (Roca 1991).

**Auxinas.** Grupo de compuestos que se caracterizan por la capacidad de inducir elongación en las células, están relacionados con la formación de los frutos y tienen íntima relación con la formación de raíces. La adición de un tipo de auxina en algunos casos es suficiente pero se ha demostrado que en muchos casos se obtiene efecto sinérgico con diversos factores de crecimiento, el emplear una auxina en cada experimento es habitual, sin embargo se ha demostrado que el uso simultáneo de diversas auxinas puede favorecer a los cultivos, el sustento de emplearlas simultáneamente es el hecho de que tienen diversos sitios de acción (Roca *et al.* 1991, Weaver 1976, Luciani *et al.* 2010 y Levitus *et al.* 2010).

**Citocininas.** Grupo de compuestos que promueven principalmente la división celular, estimulan la formación de yemas de crecimiento, regulan la diferenciación en los tejidos y retardan el envejecimiento en los tejidos vegetales. Todas las Citocininas de origen endógeno se derivan de la adenina. Se ha demostrado que se incorporan a los ácidos nucleicos en las células. (Roca *et al.* 1991, Weaver 1976, Luciani *et al.* 2010 y Levitus *et al.* 2010)

**Giberelinas.** Alargamiento de los tallos, estimulación del crecimiento, se estimula el crecimiento en los internodios y frecuentemente se incrementa la longitud de los internodios individuales, pueden provocar la floración, produce un incremento en la división

celular en el meristemo de la zona sub-apical (Roca *et al.* 1991, Weaver 1976, Luciani *et al.* 2010 y Levitus *et al.* 2010)

El uso de estos compuestos en la propagación de epifitas, es un hecho común. Se han utilizado el carbón activado y el agua de coco como activadores de la germinación y micro propagación de *Tillandsia callifanii*, según reporta Molina (1998), quien lo aplicó en diferentes concentraciones en medio Murashige & Skoog (MS).

Lo más común en la propagación ha sido el uso de citocininas. Bencil Amino Purina (BAP) ha demostrado en gran número de especies que al ser adicionada al medio de cultivo, es capaz de permitirle a los organismos superar la dominancia apical y liberar las yemas laterales de la dormancia, dando lugar así a la formación de brotes laterales (Vargas *et al.* 2010). Entre otros trabajos tenemos el caso de Sosa *et al.* (2012), quien empleo este regulador en la propagación *in-vitro* de *Achmea fascianta*, promoviendo la regeneración de plantas completas, Asimismo, Zimmer *et al* (1993), llevo a cabo pruebas con la citocinina (BAP) en la propagación vegetativa de algunas especies de *Tillandsias* por inmersión total y por roció en las hojas de las plantas, consiguiendo buenos resultados en la multiplicación vegetativa. Por su parte Bessler en 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 de los brotes formados.

La micropropagación a partir de semilla y ápices de tallo, junto con el uso de regulador BAP, fue una investigación de Huidobro (2003), quien la propuso como procedimiento de micropropagación *in-vitro* de *Tillandsia erubescens*. Sus conclusiones señalan una germinación que se completa en 12 semanas, y el desarrollo de hasta 8 brotes por explante con influencia del regulador BAP en diferentes concentraciones. Por su parte, Mancilla (2007) utilizó una concentración de 1mg por litro en la micropropagación de *T. caput-medusae*. Sus resultados fueron 22 brotes por planta y 42 hojas por planta-brote en diferentes condiciones experimentales.

### ☞ *Tillandsia caput-medusae*

Esta es una especie que pertenece a las denominadas tillandsias grises, o también llamadas “atmosféricas”. presenta desarrollo de tipo epifítico durante todo su ciclo de vida (fotos 5-6); es carente de tallo; presenta inflorescencias de 15 a 25 cm de alto, aunque llega a tener hasta 40cm; cuenta con láminas foliares (7-10 laminas generalmente) de morfología triangular alargada (15-25cm de largo)(fotos 7-8), las cuales están cubiertas con escamas planas llamadas tricomas (fotos 9-10), que proveen el color grisáceo característico, en la parte adaxial presentan 54 tricomas por mm<sup>2</sup>, y en la abaxial 16 por mm<sup>2</sup>según lo señalado por Stefano en el 2007. Las láminas forman vainas ampliamente ovaladas en la base, dispuestas a manera de roseta, que al unirse forma un pseudobulbo ovoide, a menudo de mayor longitud que la inflorescencia (Gómez 1991).



Fotos 5, 6. Morfología de *T. caput-medusae*



Fotos 7, 8. Morfología de *T. caput-medusae*

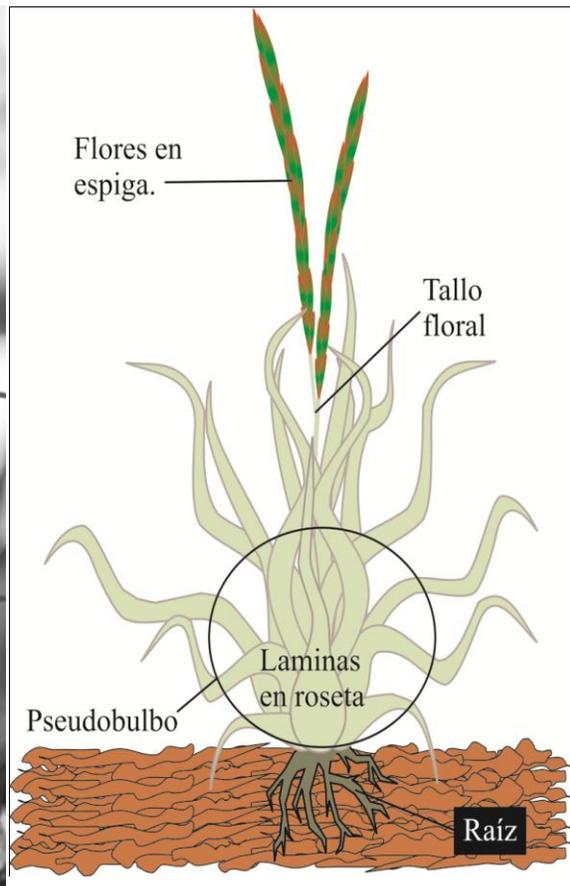


Fotos 9-10 Tricomas de *T. caput-medusae* colectados en el estado de Morelos.

El escapo floral es erecto o ascendente, delgado, con brácteas densamente imbricadas, foliáceas (foto 11 y esquema 1). La inflorescencia va de morada a lila, de forma simple o digitadamente compuesta de dos a seis picos. Las brácteas primarias ampliamente ovaladas, usualmente más pequeñas que las brácteas florales, y con pequeña lámina o sin ella. Las brácteas florales suberectas o divergentes, imbricadas, ovaladas-lanceoladas, obtusas pero el ápice en ocasiones enrollado y de apariencia aguda, iguales o ligeramente mayores que los sépalos. La inflorescencia es de 6-12 flores con varias brácteas en la base que son estériles y reducidas. Las capsulas son de forma cilíndrica delgada de 3-4cm de largo. (Smith *et al* 1977).



Foto 11. Morfología de *T.caput-medusae* con capsulas.



Esquema 1. Morfología de *T.caput-medusae*

Se establece natural mente en los lados de los troncos y en las partes ventrales de las ramas grandes, en la parte media del dosel (véase foto 12). Se les puede encontrar como ejemplares solitarios o formando racimos (en muchos casos por reproducción vegetativa) (Smith *et al* 1977).



Fotos 9. Desarrollo en racimos de *T. caput-medusae* E. Morren.

Se desarrolla en bosques deciduos secos, semideciduos y húmedos, entre los 40 y 2400msnm, Crecen sobre árboles como encinos y pinos principal mente presentando la floración de Febrero a Mayo (en promedio toma al menos cinco años de desarrollo para que pueda desarrollar flores) (Smith 1977). En la mayoría de los casos presenta relaciones de tipo fitotelmata con hormigas y/o otros artrópodos, los cuales habitan en la base de las hojas (véase fotos 13-24).



Fotos 13-24. Artrópodos encontrados en ejemplares de *T. caput-medusae* colectados en Morelos.

Esta ampliamente distribuida, principalmente en bosques húmedos de montaña (BHM), desde México a Costa Rica; en México se reporto en el año de 1977 en Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango Guadalajara, Guerrero, Jalisco, Edo. México, Michoacán Morelos Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora y Veracruz (Smith 1977); pero en los últimos años esta reportada en Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Distrito federal, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz y Zacatecas.(CONABIO 2010)

## ∞ Justificación

El interés particular de trabajar con *T. caput-medusae* E. Morren, surge de su importancia ecológica, principal mente por ser Mirmecofita. Estudios recientes como el realizado por Aguilera *et al.* (2011), han mostrado que las relaciones de epifitas fitotelmata permiten el desarrollo de una amplia gama de microecosistemas y también aportan una porción considerable de biomasa del ecosistema. También existen trabajos señalando que de los microecosistemas dependen diversos taxa de invertebrados, vertebrados y algunos otros organismos degradadores.. Por lo cual la conservación de *T.caput medusae* está ligada a la de la diversidad de invertebrados del lugar donde se desarrolla, y al aporte de la biomasa del mismo.

Su importancia en la ciencia se ha comprobado en distintos trabajos. En los que el potencial de las tillandsias grises para el biomonitoreo de contaminantes en el aire se a evaluado de manera positiva. Tal es el caso particular del trabajo de Brighigna *et al.* en 1997, 2000 y 2002. En los cuales comprueba que *T. caput-medusae.* puede ser utilizada al igual que otras

tillandsias gris en el monitoreo atmosférico, esto por la capacidad, bioacumuladora de sustancias suspendidas en el aire.

Otro aspecto importante de la especie surge de sus diversos usos potenciales. De los cuales debemos resaltar el potencial como planta de ornato (recurso económico en algunas localidades), ya que es reconocida en el mercado a nivel internacional y demandada por los principales países importadores de plantas de Europa y Japón. Lamentable mente en la actualidad su demanda como planta de ornato no se satisface adecuadamente ya que la mayoría de los ejemplares vendidos son extraídos de sus ambientes naturales. La principal limitante en la producción está dada por la naturaleza de la especie, ya que la tasa de reproducción vegetativa in vivo es muy baja (tres brotes por planta en cada momento de desarrollo floral), y la reproducción sexual solo llega a 60% de imbibición y formación de hojas primarias (Díaz *et al.* 2013).

Conjuntando la importancia ecológica, los usos potenciales, la problemática derivada de sus usos, las estrategias de propagación mas recurridas en *Tillandsia*, y dado que existe mucha variación en los resultados obtenidos en el empleo del regulador de crecimiento BAP entre otras especies e incluso con la misma.

El presente trabajo está enfocado en la búsqueda de una metodología apropiada para la producción de *T. caput-medusae*. mediante pruebas de viabilidad (TTC y tiempos de imbibición), la realización del estudio de propagación a partir de semilla *in-vitro* y el análisis del efecto de diferentes concentraciones de BAP en la multiplicación de las plántulas.

## ∞ **Objetivos**

### ∞ **General**

Propagar en medio de cultivo *in-vitro* KC *Tillandsia caput-medusae* E. Morren

### ∞ **Específicos**

Evaluar mediante la prueba de TTC la viabilidad de *T. caput medusae* en semillas frescas, de seis meses y después de un año.

Propagar por semilla *Tillandsia caput-medusae* en cultivos *in-vitro*.

Analizar el efecto y la multiplicación vegetativa producida por exponer plántulas de *Tillandsia caput medusae*. E Morren en diferentes concentraciones del regulador de crecimiento BAP.

## ∞ Diseño experimental

El procedimiento se dividió en dos etapas experimentales (germinación *in vitro* y propagación vegetativa *in-vitro* a partir de plántulas con diferentes concentraciones del regulador de crecimiento BAP).

### ∞ Primera etapa

Se adquirieron plantas adultas que contaran con capsulas maduras de la localidad de Santiago, Estado de Morelos (foto 25). Posteriormente se realizó la asepsia y desinfección de las mismas por métodos estándar de propagación *in-vitro* (Roca *et al.* 1991, Luciani *et al.* 2010 y Levitus *et al.* 2010), con la particularidad de que se retiró la parte plumosa de la semilla en su totalidad.



Foto 22. Ejemplar colectado de *T.caput-medusae* con capsulas maduras.

Para garantizar el número de organismos experimentales que fuera estadísticamente significativo y para los diferentes ensayos posteriores a la germinación, se colocaron 32 lotes con 30 semillas cada uno (960 semillas en total).

- **Viabilidad**

Para ver el efecto en la viabilidad de la semilla a través del tiempo. Se empleo la prueba de TTC. Para analizar la viabilidad se utilizo como criterio de semilla positiva solo aquellas que presentaron tinción completa. Se consideraron tres momentos, el primero fue semilla fresca, el segundo de semilla con seis meses de almacenamiento y el tercero con semillas después de un año. Cada uno se cuantifico con poblaciones de 50 semillas y por triplicado para su análisis estadístico. Además de ello se tomaron para cada prueba 3 tiempos de imbibición diferentes.

Tabla 1. Prueba de TTC

|                         | Edad de la semilla |             |             |
|-------------------------|--------------------|-------------|-------------|
|                         | reciente           | meses       | año         |
| <b>Repetición 1 TTC</b> | 50 semillas        | 50 semillas | 50 semillas |
| <b>Repetición 2 TTC</b> | 50 semillas        | 50 semillas | 50 semillas |
| <b>Repetición 3 TTC</b> | 50 semillas        | 50 semillas | 50 semillas |

- **Germinación**

Una vez realizada la asepsia de las semillas se colocaron en medios de Knucson C. formula (4128) Sigma, sin vitaminas y sustituyendo el

compuesto gelificante agar-agar por Fitagel (Huidobro. 2003). Para estimar el porcentaje de germinación *in-vitro* se evaluaron los resultados obtenidos de los lotes experimentales de los medios *in-vitro* y las 120 semillas frescas empleadas en la prueba de viabilidad (TTC).

Partiendo del criterio establecido por Brighigna (2002), en nuestro trabajo para considerar la germinación como completa, los organismos debían pasar por tres momentos (hidratación, emergencia de hojas primarias y emergencia radicular).

Los resultados que se obtuvieron de las semillas frescas sometidas a la prueba de TTC también fueron empleados para analizar las posibles causas de la pérdida de organismos durante la imbibición.

## ☞ Segunda etapa

- Multiplicación

Se desde la elaboración de los medios de cultivo experimentales KC adicionados con concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg/l del regulador de crecimiento BAP.

Ya comprobada la asepsia en los medios de cultivo experimentales, se trasplantaron 100 plántulas de la etapa uno a los medios adicionados con diferentes concentraciones de BAP.

El modelo de trabajo se estableció con la distribución de cinco plántulas por unidad experimental y cinco repeticiones de cada uno de los tratamientos. Se formaron así los 3 tratamientos con cinco repeticiones, más el control que consistió en medios sin regulador (tabla 2)

Tabla 2. Conformación de las unidades experimentales

| Distribución de individuos por tratamiento con BAP |              |              |              |              |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
|  | [ 0 ] BAP    | [ .5 ] BAP   | [ 1 ] BAP    | [ 2 ] BAP    |
| Repetición 1                                       | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos |
| Repetición 2                                       | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos |
| Repetición 3                                       | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos |
| Repetición 4                                       | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos |
| Repetición 5                                       | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos | 5 individuos |
|  | N=25         | N=25         | N=25         | N=25         |

Durante el proceso de multiplicación vegetativa se analizaron cuatro procesos que presentaron las plántulas: formación de brotes laterales, cambios morfológicos en las láminas foliares, formación de callos y oxidación de organismos.

El efecto del regulador para cada evento se estimó estadísticamente mediante ANOVA de una variable y las diferencias entre las medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey (Sigma, ver.11).

Para la caracterización morfo-anatómica, se realizaron cortes histológicos y se describieron los siguientes componentes en base al grosor de las capas y al tamaño celular. Cabe resaltar que los cortes se realizaron de forma transversal en la parte media de la lámina foliar, con lo cual se logro estimar los diámetros del estrato cortico, clorenquimatico e hidrenquimatico. (Foto 23)



Foto 23. Tejidos claramente diferenciados (foto de corte histológico en el grupo control)

La primera capa (E. cortico)

Es la encargada de recubrimiento, protección, soporte, entrada de nutrientes y de agua. En esta se encuentran los tricomas expuestos al medio externo.

La segunda capa (E. Clorenquimático)

Es la que cuenta con la capacidad fotosintética (fotosíntesis tipo CAM facultativa) y además integra a lo largo de su porción media los haces vasculares que cumplen con la función de transporte.

La última capa (E. Hidrénquimatico)

Cuenta con capacidad de almacenamiento de reservas (principalmente nutrientes y agua).

Para mejor entendimiento del esquema de trabajo, se elaboro el diagrama 1.

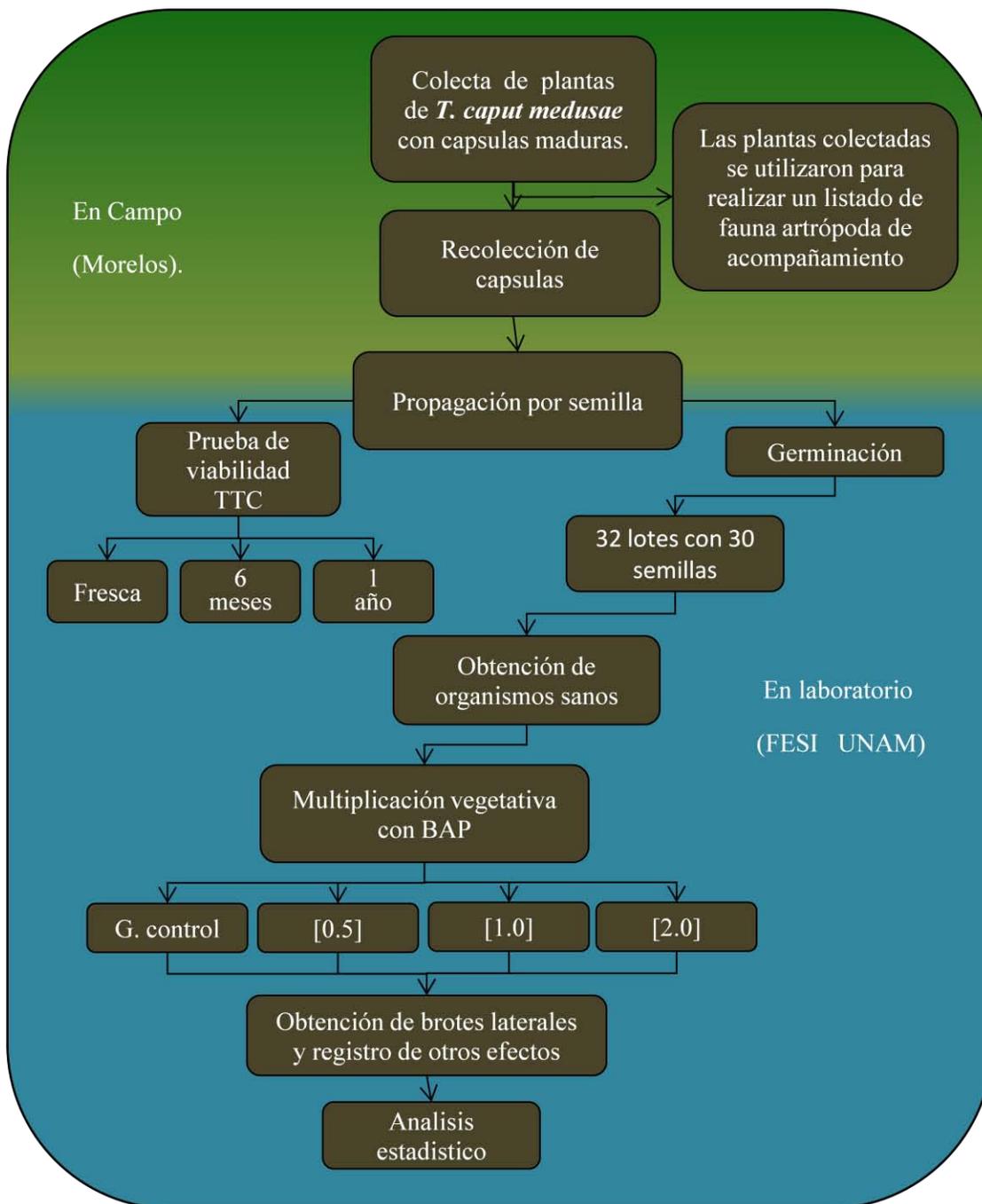


Diagrama 1 Esquema de trabajo en la propagación de *T. caput-medusae*.

## ∞ Resultados

### ☞ Primera etapa

- Viabilidad

Los resultados a partir de TTC mostraron diferencias estadísticas en la viabilidad entre lotes de diferente tiempo de colecta, indicando disminución conforme a mayor tiempo. La viabilidad de las semillas frescas de *T. caput medusae* es casi total, después de 6 meses reduce su viabilidad en pequeña escala con respecto a las de un año. Se reporta que al incrementar el tiempo de imbibición al triple de lo común se crece la posibilidad de germinación incluso por encima del porcentaje señalado en la prueba de TTC. (Tabla 3)

Foto 24. Semilla sometida a la prueba de viabilidad por medio de TTC.



Tabla 3. Resultados de pruebas de viabilidad.

| Parámetros  |                     | % de semillas positivas a tinción |         |       |
|---|---------------------|-----------------------------------|---------|-------|
|   |                     | Reciente                          | 6 meses | 1 año |
| % de viabilidad según TTC   |                     | 99                                | 60      | 10    |
| % de formación de primordios foliares según tiempos de imbibición | Imbibición estándar | 99                                | 36      | 3     |
|   | Doble de tiempo     | 99                                | 37      | 4     |
|   | Triple de tiempo    | 99                                | 64      | 12    |

- Germinación

El proceso de germinación de *T. caput-medusae* cultivada in vitro en este trabajo, considero tres etapas:

Etapa de hinchamiento, de emergencia de foliolos y formación de raíz, estando de esta forma el individuo completo. Todo el proceso, se completo en un periodo alrededor de cuatro meses y medio, donde la primera fase se alcanzo escasamente en una semana, la formación de foliolos casi un mes y el resto fue el periodo de formación de raíz (fotografías 25-28). En general la aparición de la última fase fue la de mayor tiempo. La germinación sin embargo en esta investigación comienza a ser afectada en la segunda etapa, aun que es de forma mínima, y ya es muy evidente para aquellos que alcanzan la emergencia radicular (solo se logra en dos tercios de las semillas iniciales). El proceso de germinación se resume en la Tabla 4.



Fotos 25-27. Proceso de germinación in-vitro: Hinchamiento (25), emergencia de hojas primarias (26) emergencia de hojas secundarias (27) enraizamiento de la planta (28).

Tabla 4. Etapas de la germinación y tiempo en alcanzarse. Los datos son el porcentaje de 967 semillas

| Tiempo          | 0                 | 8 días                | 15                 | 32 días                                | 64                            | 134 días               |                       |
|-----------------|-------------------|-----------------------|--------------------|--|-------------------------------|------------------------|-----------------------|
|                 | Inicio            | E#1                   |                    | E#2                                    |                               | E#3.1                  |                       |
| Etapas          | Total de semillas | Semillas no hinchadas | Semillas hinchadas | Oxidación en la formación de plántulas | Emergencia de hojas primarias | Oxidación de plántulas | Emergencia radicular. |
| % Total de indi | 100%              | 0.52                  | 99.48              | 26.37                                  | 73.11                         | 12.72                  | 60.39                 |

Cabe destacar, que se registraron periodos de aparente inactividad o etapas intermedias entre los tres tiempos de respuesta (hinchamiento, emergencia de hojas primarias y emergencia radicular).

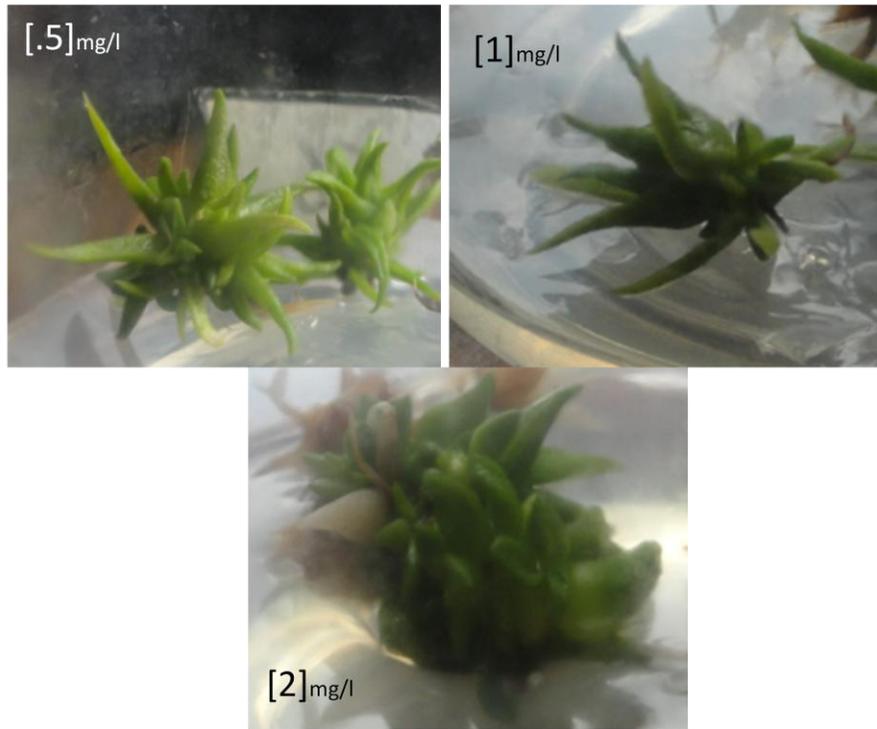
También es importante resaltar que la pérdida o mortandad de organismos se debió a procesos oxidativos durante las etapas del proceso germinativo. Se registro oxidación durante la etapa de génesis y de formación de folíolos.

## ☞ Segunda etapa

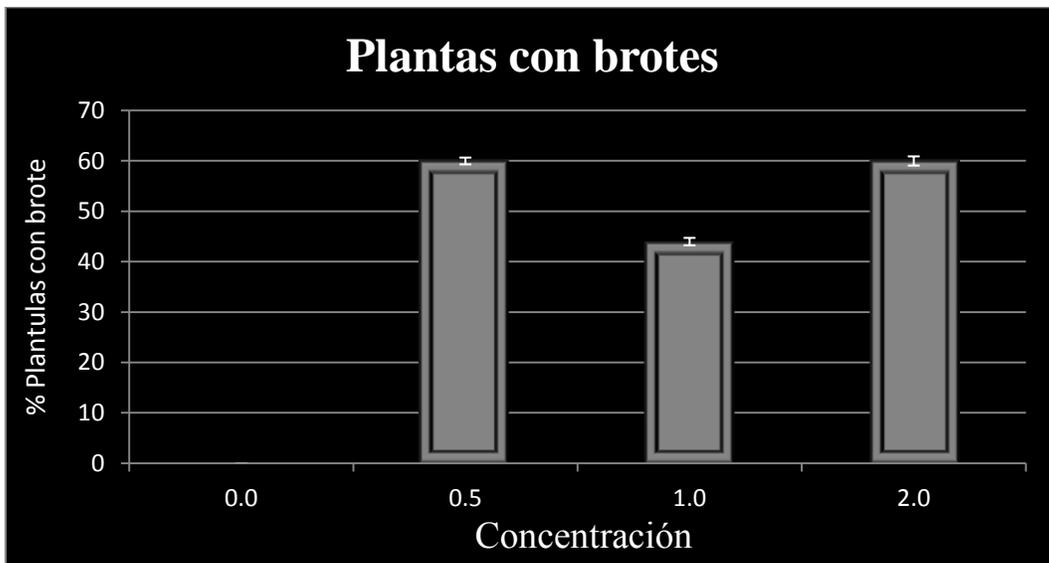
- Multiplicación

La multiplicación vegetativa de *T. caput medusae* mostro respuestas significativas estadísticamente P igual o mayor a 0.01 por el efecto del regulador, tanto en el número de plantas con brote como en los brotes por planta.

En cuanto al número de plantas con brote, se detectó una influencia muy significativa estadísticamente ( $P < 0.01$ ). Donde los tratamientos extremos (de acuerdo a la prueba de Tukey) estimularon el mayor número de plantas con brotes laterales a diferencia de la concentración intermedia. (Fotos 29-31 y grafica 1).

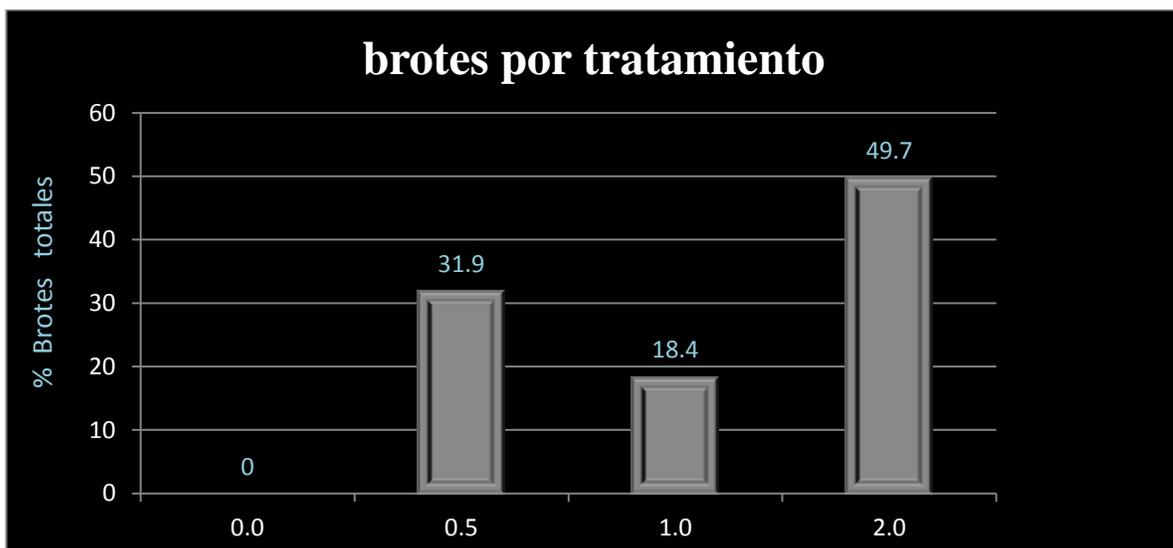


Fotos 29-31. Plantas con brote en los tratamientos .5, 1 y 2mg/l de BAP respectivamente.



Grafica 1. Total de plantas con brote, y las concentraciones de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas.

En cuanto a los brotes por tratamiento, BAP ejerció un patrón semejante de respuesta, ocasiono un efecto estimulatorio altamente significativo de  $P < 0.001$ . Grafica 2.



Grafica 2. Total brotes por tratamiento, y las concentraciones de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas.

- Formación de callos

Existe efecto del regulador en la formación de callos, aunque es dependiente de la concentración; únicamente, se registro a la concentración de 2.0mg/l de BAP ( $P < 0.05$ ) véase tabla 5

Tabla 5. Influencia de BAP en la formación de callo.

|                  | G. control | .5mg/l BAP | 1 mg/l BAP | 2 mg/l BAP |
|------------------|------------|------------|------------|------------|
| Número de callos | 0          | 0          | 0          | 4          |

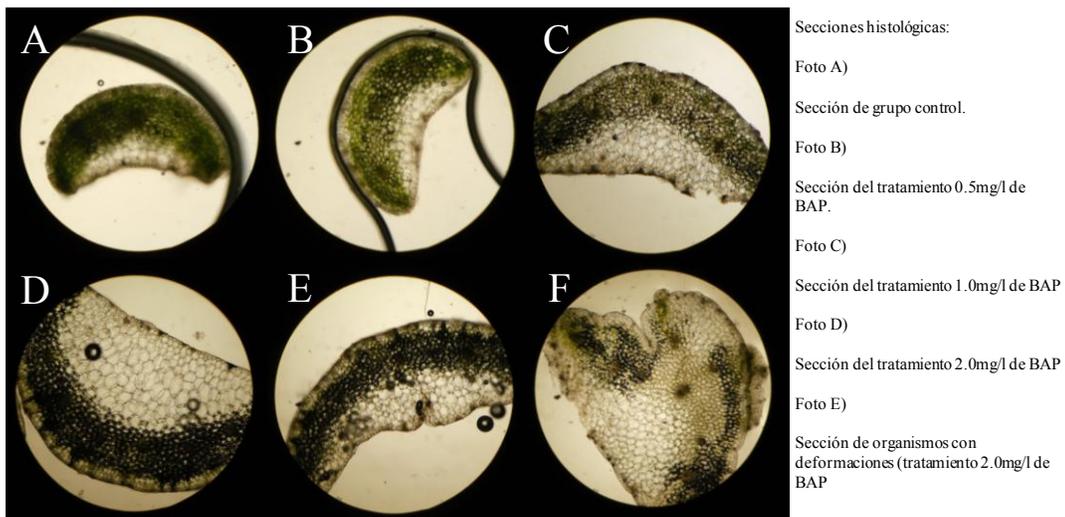
- Sintomatologías asociadas a la multiplicación

En cuanto a las respuestas morfo-anatómicas inducidas por la exposición al regulador BAP, se observa que además de alterar los rasgos de multiplicación, también presentaron de forma evidente un efecto sobre la morfo-anatomía de los organismos experimentales (ajustar fotos 18-20). Particularmente en el tamaño celular, grosor de los estratos celulares, la hiperhidratación y además de la oxidación. Se procedió a realizar cortes de organismos de los diferentes tratamientos para analizarlas.

Los cambios morfológicos se hicieron perceptibles por las diferencias en el grosor de las laminas foliares entre los tratamientos (fotos 32-34).



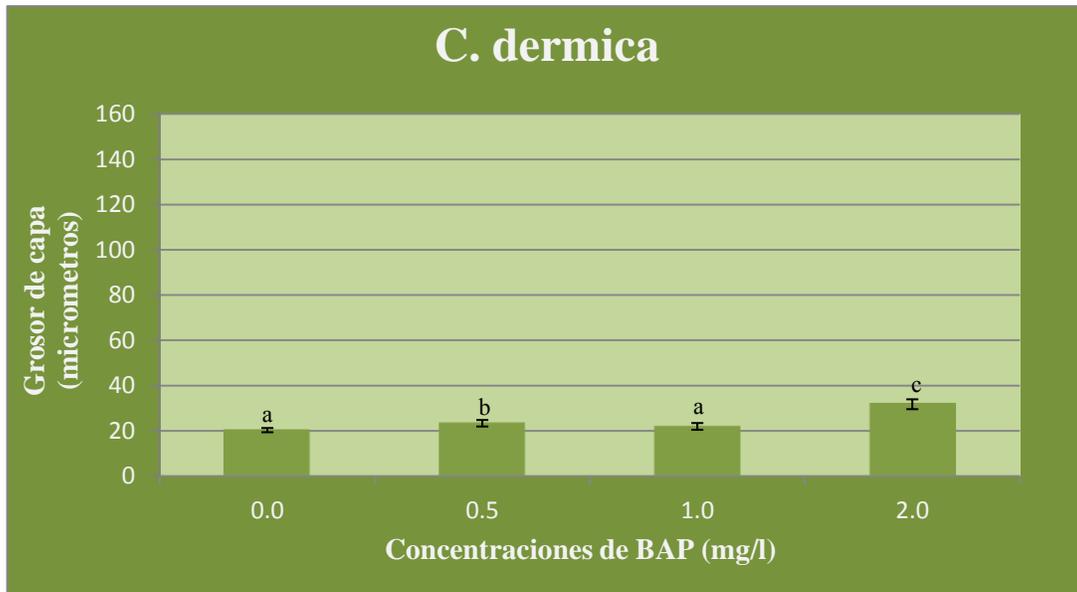
Fotos 35-40. Brotes en los tratamientos. (Tratamiento 2mg/l BAP, tratamiento 1mg/l BAP y tratamiento 0.5mg/l BAP)



Fotos 35-40. Fotos de cortes histológicos en los tratamientos y grupo control.

- Descripción de las capas

En la capa dérmica se observó que la concentración de 0.5 y de 2.0 mg/l provocaron un aumento significativo en el espesor de esta capa ( $P < 0.05$ ) hasta casi el 30 %, con respecto al grupo control (gráfica 3 y tabla 6).

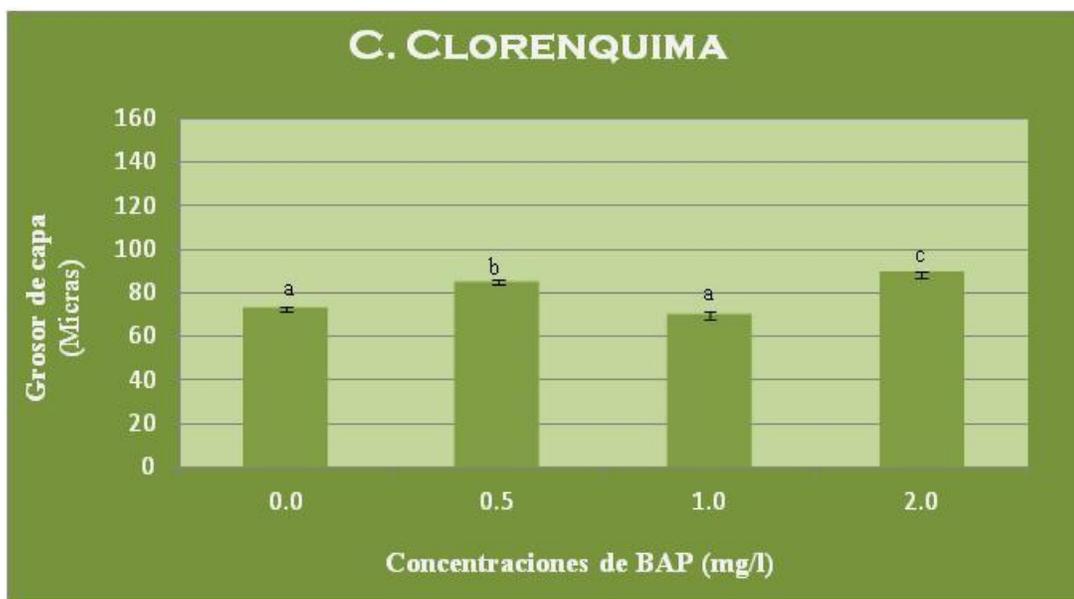


Gráfica 3. Grosor de capa dérmica en los tratamientos de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas. Letras iguales significan valores semejantes.

Tabla 6. Resultados de diferencias entre los tratamientos por la prueba de Tukey

| All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test): |        |
|---|--------|
| Comparison  | P<0.05 |
| 2.0 vs Gc   | Yes    |
| 2.0 vs 1.0  | Yes    |
| 2.0 vs 0.5  | Yes    |
| 0.5 vs Gc   | Yes    |
| 0.5 vs 1.0  | Yes    |
| 1.0 vs Gc   | No     |

Para la zona del Clorenquima se registraron modificaciones en su espesor dependiendo la concentración del regulador en el medio. Cabe destacar que en esta capa se observaron respuestas estimulatorias solo en las concentraciones extremas (hasta alrededor de 12%  $P < 0.05$ ) (grafica 4).

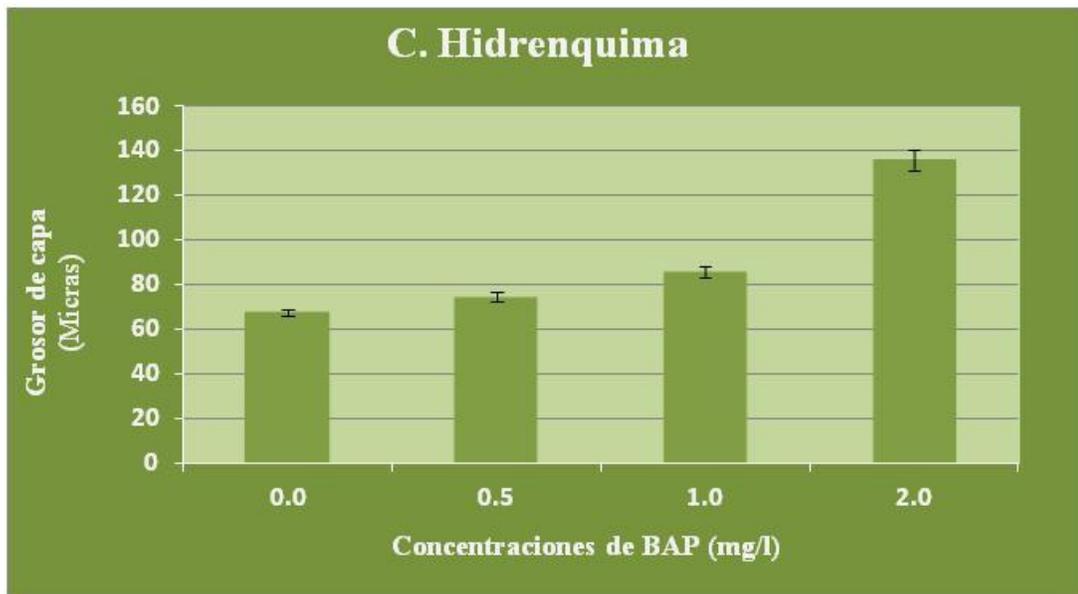


Grafica 4 Grosor de capa clorenquimatica, y las concentraciones de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas. Letras identicas son pruebas no significativas, letras identicas demuestra diferencias significativas.

Tabla 7. Resultados de diferencias entre los tratamientos por la prueba de Tukey.

| All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test): |        |
|---|--------|
| Comparison  | P<0.05 |
| 2.0 vs Gc   | Yes    |
| 2.0 vs 1.0  | Yes    |
| 2.0 vs 0.5  | Yes    |
| 0.5 vs Gc   | Yes    |
| 0.5 vs 1.0  | Yes    |
| 1.0 vs Gc   | No     |

En lo que la sección del Hidrenquima concierne, el efecto del regulador produce una relación directamente proporcional a la concentración: a mayor concentración mayor efecto de ensanchamiento en esta capa (grafica 5). El aumento en el grosor por efecto del regulador fue estadísticamente significativo (prueba de Tukey), ( $P < 0.05$ ), aun entre tratamientos experimentales. Tabla 8.



Grafica 5 Grosor de capa hidrenquimatica, y las concentraciones de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas.

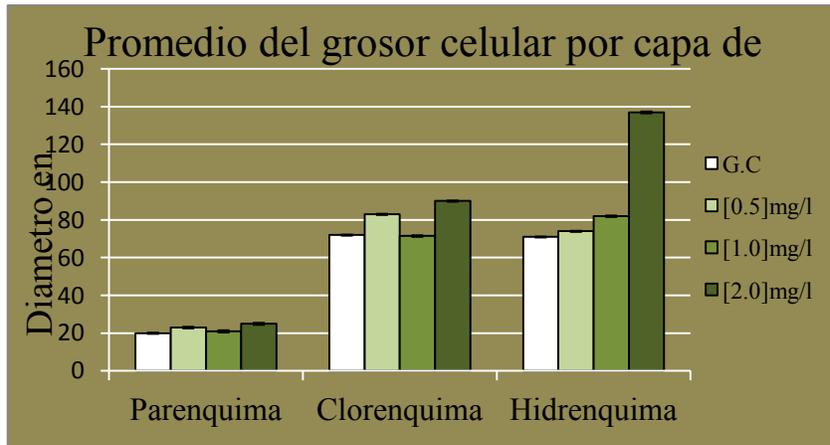
Tabla 8. Resultados de diferencias entre los tratamientos por la prueba de Tukey.

| All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test): |        |
|---|--------|
| Comparison  | P<0.05 |
| 2.0 vs Gc   | Yes    |
| 2.0 vs 1.0  | Yes    |
| 2.0 vs 0.5  | Yes    |
| 0.5 vs Gc   | Yes    |
| 0.5 vs 1.0  | Yes    |
| 1.0 vs Gc   | Yes    |

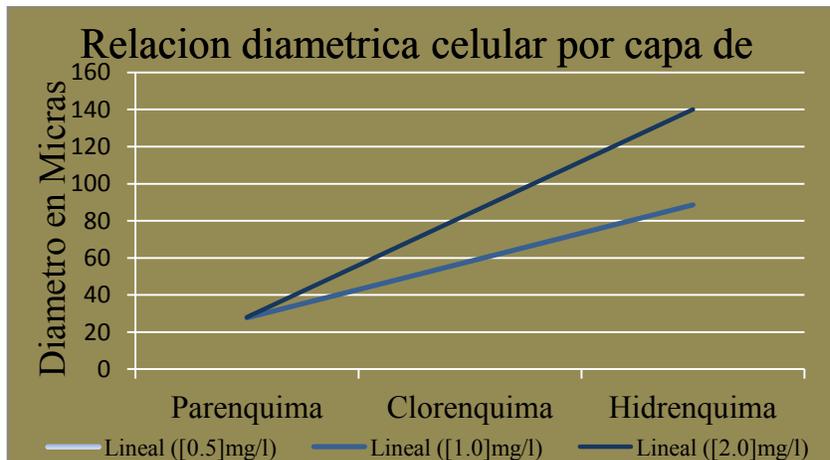
- Tamaños celulares

El tamaño celular que mas fue modificado fue el del tejido hidrenquimatico y a la concentración de 2

En el tamaño celular el regulador si tiene un efecto según el tejido: básicamente en el parénquima e Hidrenquima (grafica 6) el efecto en el tamaño se da según la concentración. Las concentraciones que inducen modificación en el tamaño celular siempre son 1 y 2mg/l, se observo un aumento del 30% en el tamaño celular en el tejido del Hidrenquima con la concentración mayor, siendo este el valor máximo en el tamaño celular.



Grafica 6 y 7 Grosor de capa hidrenquimatica, y las concentraciones de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas de G.C. (grupo control), concentraciones de .5, 1 y 2mg/l.



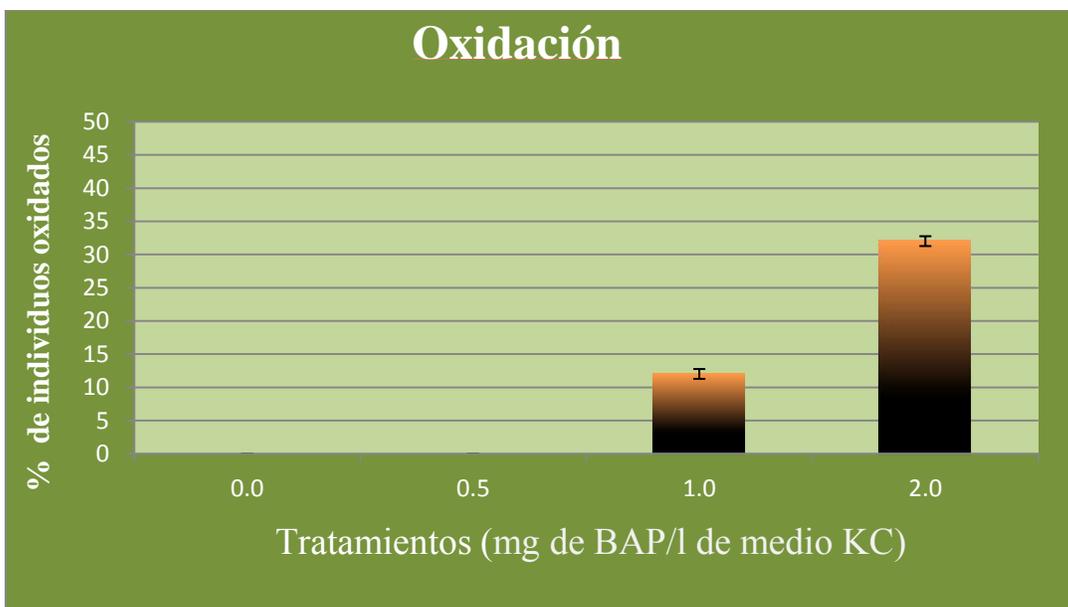
- Oxidación

El síntoma de oxidación en realidad es un proceso que se percibe a partir de las primeras etapas de la germinación (tabla 9 y grafica 8) y que continúa en la multiplicación.

En ésta se demostró que al igual que en las modificaciones diametricas del hidrenquima, la oxidación también exhibió un efecto estadísticamente significativo entre los tratamientos por BAP. Cabe destacar que a concentraciones mayores a 1.0 mg/l de BAP, la oxidación se dispara seis o siete veces más que a la concentración precedente (fotos)



Fotos 26-28. Oxidación en los tratamientos (2.0, 1.0 y 0.5 mg/l de BAP)



Grafica 8. Individuos oxidados, y las concentraciones de BAP. Los datos son el promedio de 25 individuos y el error estándar de cuatro réplicas.

Hay que destacar que por el hecho de tener dos tratamientos con valor de cero se empleo el método de Dunn's para correlacionar los tratamientos. Así se pudo demostrar que la diferencia de los valores de oxidación obtenidos para los tratamientos de 1 y 2 mg/l de BAP son significativos ( $P < 0.05$ , tabla 6)

Tabla 9. Resultados de diferencias entre los tratamientos por la prueba de Dunn's.

| All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) : |        |
|---|--------|
| Comparison  | P<0.05 |
| 2.0 vs Gc   | Yes    |
| 2.0 vs 0.5  | Yes    |
| 2.0 vs 1.0  | Yes    |
| 1.0 vs Gc   | Yes    |
| 1.0 vs 0.5  | Yes    |
| 0.5 vs Gc   | No     |

## ∞ Discusión

### ∞ Viabilidad

Si bien se tiene documentado en la mayoría de los trabajos, que la viabilidad no sobrepasa de 6 meses (Ceja 2008), podemos señalar de forma asertiva al igual que Molina (1999) que parece presentarse latencia en las semillas de algunas tillandsias. Para el caso de *T. caput medusae* E. Morren presenta germinación aún después de un año y aparente mente se rompe la latencia secundaria extendiendo el tiempo de imbibición al triple con respecto al estándar.

### ∞ Germinación

En lo referente a la germinación de *T. caput medusae* encontramos que los criterios utilizados para este proceso varían dependiendo de los investigadores. En el 2002 Alessio Papini en la investigación dirigida por Luigi Brighignia. Señala que para considerar completo el proceso de germinación se debe presentar el desarrollo de al menos tres laminas foliares y primordios de desarrollo del hipocotilo.

Con este criterio, la germinación de *Tillandsia caput-meduse* E. Morren en este estudio, indica que tiene una alta tasa de germinación (73.1% de semillas que forman hojas primarias), en relación al 45%, y el 15.2% de *T. fasciculata* y *T. violácea*, respectivamente; pero es ligeramente inferior al 83.3%, 79.8% 79.5%, y 75.8%, de *T. bourgaei*, *T. makoyana*, *T. carlos-hankii* y *T. prodigiosa* respectivamente, y reportados por Sosa *al.* 2012. Esto parece apuntar hacia la dirección de que la germinación, en este grupo puede ser especie-especifica como se observa para otros organismos; o bien la edad de la semilla, o las condiciones en que se germinaron.

## ☞ Multiplicación

Nuestros resultados al igual que los reportados en los trabajos de multiplicación en otras tillandsias con el uso del regulador BAP (como por ejemplo Molina 1999, Huidobro 2003, Mansilla 2007), son congruentes en cuanto al efecto positivo en la multiplicación. Desafortunadamente las concentraciones y métodos de emplear el regulador de crecimiento de manera idónea son diversas en cada trabajo.

En el trabajo de Bessler B. (1997) se aplicaron cinco concentraciones de BAP, (las cuales están dentro del rango de concentraciones que empleamos). Su trabajo consistió en evaluar el efecto de las concentraciones en dos metodologías distintas. En la primera trabajo diferentes frecuencias de aspersión a explantes de *T. cacticola* y *T. butzii*, el señala que el regulador BAP tiene mayor efecto en la estimulación de brotes laterales para *T. cacticola* en la concentración de 5mg/l. Para el caso de *T. butzii* obtuvieron mejor respuesta en la concentración de 2.5mg/l. En la segunda metodología empleo el regulador BAP mediante la inmersión total de las plantas en los distintos tratamientos durante 24h por tres ocasiones, en este caso obtuvo la muerte de todos los organismos a corto plazo, en el trabajo no señalan el problema que dio lugar a la muerte de los organismos.

En cuanto al empleo de BAP en *T. caput-medusae*, reportamos de la misma forma que en otros trabajos el efecto positivo al aplicar el regulador de crecimiento en la estimulación de brotes laterales. Tal es el caso del trabajo realizado en Guatemala por Mansilla Méndez (2007) en su trabajo titulado “PROPAGACIÓN IN VITRO DE LA ESPECIE EPÍFITA *Tillandsia caput-medusae* (Bromeliaceae) CON FINES DE USO SOSTENIBLE”. Al igual que lo obtenido por Orozco Castillo (2011) en el trabajo “Propagación *in vivo* e *in vitro* de cinco especies de *Tillandsia* en vías de extinción y de potencial uso sustentable”. Sin embargo los tres trabajos presentamos discrepancias en

diversos aspectos. Una diferencia metodológica entre el trabajo de Mancilla, el de Orozco y el presente trabajo es el empleo de mas concentraciones del regulador (0.0, 0.5, 1.0, 1.5, y 2.0mg/l de BAP) por mancilla y Orozco.

En la evaluación de concentraciones de BAP que estimulan mayor número de brotes por planta, obtuvimos el mejor resultado en la concentración de 2mg/l (con 16 brotes), mientras que Macnilla señala la concentración de 1mg/l (hasta 22.25 brotes). Y por su parte Orozco señala la concentración de 1.5mg/l (de 18.5 a 22.2 brotes).

Es importante señalar que en el grupo control (medios de crecimiento sin regulador), los lotes de nuestro trabajo no desarrollaron brotes. Mientras que si se presentaron en el trabajo de Mancilla y de Orozco.

Se observo oxidación a lo largo del proceso de germinación y posterior mente durante la etapa de multiplicación. Este evento es causa de un alto porcentaje de pérdida de organismos en la propagación in-vitro. Se ha observado que algunos tipos de plantas, particularmente plantas tropicales, las cuales contienen altas concentraciones de sustancias fenólicas que pueden ser oxidadas cuando las células se multiplican o mueren. En estos casos se ha visto que el tejido se vuelve café o negro y decae (Roca 1991, Díaz 2007, Azofeifa. 2009, Luciani 2010 y Mroginski 2010).

Los efectos de hiperhidratación y oxidativos obtenidos como producto del empleo de la citocinina BAP que reportamos en la etapa de multiplicación tienen el mismo comportamiento que lo reportado por Vargas *et al.* en el 2010 al emplear BAP en el cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (a mayor concentración de la citocinina, mayor efecto oxidativo). En los trabajos relacionados con la multiplicación de caput no son reportados los eventos de oxidación.

Otro de los eventos que se presento durante la multiplicación de *T.caput medusae* fue la presencia de plantas hiperhidratadas, principal mente en las concentraciones más altas del regulador. Se han reportado que las causas de la hiperhidratación son diversas, Debergh *et al.* (1981) menciona la hiperhidratación en concentraciones de 0.6% de agar bacteriológico, y que

estos síntomas desaparecen al emplear concentraciones de 1.1%. Otros autores como Loreti (1986) menciona que la hiperhidratación puede solucionarse cambiando el tipo de gelificante o usando mezclas de 0.7gr por litro de agar con 0.5g/l de pectina, sin embargo el uso de mayores concentraciones de agar puede afectar la movilidad de enzimas y carbohidratos, altas concentraciones de agar impiden la absorción de BAP; y Huidobro 2003 reporta hiperhidratación en plantas cultivadas en bajas concentraciones de sacarosa menores a 07g/l. en los trabajos revisados de *T.caput medusae* tampoco han sido reportados los eventos de hiperhidratación influenciados por las altas concentraciones del regulador BAP

De los desórdenes morfo-fisiológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en las plantas de cultivo *in vitro*, la hiper-hidratación y la oxidación son dos muy comunes, se les ha relacionado con el desencadenamiento de otros fenómenos perjudiciales en el desarrollo de los organismos (Roca 1991, Luciani 2010 y Mroginski 2010). La hiper-hidratación es común en condiciones *in vitro* y los individuos que se originan son frágiles y tienen una apariencia vidriosa de ahí el término vitrificación con el que también se le conoce a este proceso. La hoja es el órgano más afectado, y en esa condición desarrolla un mesofilo desorganizado de parénquima esponjoso, con grandes espacios intercelulares. Las plantas hiper-hidratadas usualmente mueren, debido a que la fotosíntesis y la respiración no se llevan a cabo correctamente (Ziv *et al.* 2000). En este trabajo, la hiper-hidratación apareció asociada a concentraciones de BAP de 1.0 y 2.0 mg/L BAP y en porcentajes de 12, 32 % respectivamente. Sin embargo, los valores se ubican dentro del intervalo de los reportados en otros estudios, aunque en este trabajo los efectos se presentaron a concentraciones menores que las reportadas. Una explicación posible a esta diferencia, es que la mayoría de las propagaciones se han realizado con especies leñosas, que presentan respuestas y naturaleza celular diferente a las herbáceas (Paques *et al.* 1984 y Pearson *et al.* 1986) y que las herbáceas (tal es el caso de *Tillandsia caput-medusae* ) están más hidratadas por tener células parenquimáticas (vivas). Esto nos lleva pensar que el proceso de la hiperhidratación es un evento especie específico.

La oxidación está relacionada con la formación de radicales libres o a la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol

oxidasa (Azofeifa *et al.* 2009). En este trabajo la oxidación y la hiperhidratación mostraron un comportamiento estrechamente ligado y por lo tanto se registraron valores similares para las mismas condiciones experimentales. Estas observaciones sin embargo son coincidentes con los trabajos de (Costa *et al.* 2005, Zavaleta *et al.* 2007). Confirmando que son efectos observados comúnmente en la propagación *in vitro* y que las soluciones generales no son factibles. Cada especie tiene características y necesidades únicas, resultado de largos procesos adaptativos y evolutivos por lo que Loreti *et al.* (1986) sugieren la posibilidad de crear medios específicos para la especie.

De las modificaciones morfoanatómicas inducidas por el regulador BAP, las modificaciones se dieron principal mente en el Hidrenquima y consistieron en el aumento del tamaño celular en las mayores concentraciones. El tamaño celular está directamente relacionado o es consecuencia de la hiperhidratación, trayendo como consecuencia por lo tanto un cambio en la estructura anatómica y la forma de la hoja. El estrato de Clorenquima es presenta fuertes modificaciones, aparente mente este estrato presenta un area mayor, pero al observarlo, la coloración es más tenue, indicándonos una disminución de los fotoreceptores. Aun que en este trabajo no se hicieron pruebas de clorofila Hudobro 2003 salas encontró que las plantas hiper hidratadas presentan menor concentración de clorofila y por lo tanto menor tasa de fotosíntesis y sobrevivencia, esto seguramente también se presento en este trabajo

## ∞ Conclusión

### ∞ Viabilidad

Las semillas frescas en la prueba de TTC (99% de viabilidad) son representativas del proceso de hidratación durante la etapa germinativa del presente trabajo, no así para el número total de organismos que llegan a plántula.

La viabilidad es inversamente proporcional a la antesis (tiempo de liberación) y al tiempo de imbibición para *T. caput-medusae*

Las semillas de *T-caput-medusae* presentaron a diferencia de otros trabajos con la especie y con otras especies, germinación incluso después de un año de su dehiscencia, para lo cual se requirió incrementar los tiempos de imbibición al triple para semillas de más de seis meses.

Funcional mente los individuos experimentales de semillas más viejas presentan disminución limitantes en su desarrollo y posiblemente en las tasas fotosintéticas, así como en la sobrevivencia de los organismos.

### ∞ Germinación

Las características que dan la composición nutrimental de KC a la mitad de su concentración son recomendables para la germinación y manutención en las primeras etapas de desarrollo en *T. caput-medusae*.

### ∞ Multiplicación

*T. caput medusae* responde de forma positiva en la producción de brotes laterales con el empleo del regulador de crecimiento BAP en concentraciones que van de .5mg/l hasta 2.0mg/l

El tratamiento que tiene mejor calificación es el de 0.5mg/l de BAP, ya que además de ser uno de los tratamientos con mayor número de brotes, también

tiene el mayor número de plantas que forman brotes y el mayor porcentaje de sobrevivencia.

El regulador de crecimiento BAP tiene un comportamiento proporcional en concentración con el número de brotes por planta.

BAP a concentraciones mayores de .5mg/l suele inducir cambios morfoanatómicos principalmente en el Clorenquima e Hidrenquima, traducidos en el aumento de los diámetros celulares y desorden de los estratos morfoanatómicos y de las hojas.

El regulador empleado en concentraciones de más de 1mg/l, provoca de alguna forma procesos oxidativos en *T.caput-medusae* E.morren.

Existe una estrecha relación entre concentración de BAP, hiperhidratación y porcentajes de oxidación.

Se requiere el empleo de agentes antioxidantes en los medios de cultivo en los que se aplique BAP.

## ∞ Bibliografía

- Smith L. B. and Downs R. J.. 1974 Flora Neotropica Monograph No. 14, Part 2 Tillandsioidea (Bromeliaceae). Organization for Flora Neotropica by Hafner Press New York A Division of Macmillan Publishing Co., Inc. Collier Macmillan Publishers London September 23, 1977
- Weaver, 1976 Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Universidad de California Editorial Trillas. México.
- Smith L. B. and Downs R. J., 1976. Monograph No. 14, Part 3 BROMELIOIDEAE (Bromeliaceae). Organization for Flora Neotropica by The New York Botanical Garden New York December 19, 1979.
- Debergh P. C. & Maene L. J.. 1981. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.* 14, 335-334.
- Murillo R. M., Palacios J. G., Labougle J. M., Bentschel E. M., Llorente J. E., Luna K., Rojas P. y Zamudio S., 1983. Variación estacional de la entomofauna asociada a *Tillandsia* spp. En una zona de transición biótica. *The Southwestern Entomologist* Vol. 8 No. 4.
- Loreti y Pasqualetto., 1986. Vitrification of plants cultured *in vitro*. *Comb. Proc. Int. Plant prop. Soc.* 36, 66-71.
- Burt. y Uteley., 1987. Contributions toward a revision of *Hechtia* (Bromeliaceae). *Brittonia* 39: 37-43.
- Roca W. M., Mrogiski L. A., 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura Fundamentos y aplicaciones. Publicación CIAT (centro internacional de agricultura Tropical) No.151
- Gómez M. A. y Winkler S., 1991. Bromelias en manglares de Guatemala. *Rev. Biol. Trop.*, 39 (2): 207-214, 1991.
- Zimmer K., Bessler B., and Vett D., 1993. Vegetative propagation of atmospheric tillandsias .3. changes in acidity of the medium during *in-vitro propagation* ,*Gartenbauwissenschaft*, 58(5), 1993, pp. 225-227
- Brighigna L., Ravanellib M., Minelli A., Ercolib L., 1997. The use of an epiphyte (*Tillandsia caput-medusae* morren) as bioindicator of air pollution in Costa Rica. *The Science of the Total Environment* 198 (1997) 175-180
- Bessler M. B., 1997. The use of 6-benzylaminopurine for rapid Multiplication of Tillandsias. *HortScience* 32(2);256-258.
- Hornung L. C. 1998. —Flora de las Bromeliáceas del Estado Mérida. Tesis de Licenciatura. Universidad de Los Andes, Fac. Ciencias.Mérida-Venezuela. 377 pp
- Molina A. N.. 1999. Germinación *in vitro* y micropropagación de *Tillandsia califanii*. Proyecto docente de investigación. Universidad Autónoma Meteropolitana. Unidad Iztapalapa. México.
- Brighigna L., Gori A., Gonnelli S. and Favilli F., 2000. The influence of air pollution on the phyllosphere microflora composition of *Tillandsia* leaves (BromeHaceae) *Rev. Bio. Trop.*, 48(2/3): 51 U 17, 2000
- Hornung L. C, and Gaviria J., 2000. Glosario y Clave ilustrada de las Bromeliáceas del Estado de Mérida Venezuela. *Plantula* 2: 119-140

Ziv. M., 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural Reviews. Wiley & Sons, Inc. Jerusalem, Israel. V. 24. p. 1-30

Brighigna L., Papini A., Mosti S., Cornia A., Bocchini P. and Galletti G., 2002. The use of tropical bromeliads (*Tillandsia* spp.) for monitoring atmospheric pollution in the town of Florence, Italy Rev. Biol. Trop. 50 (2): 577-584, 2002

Amado F. G. M., Andradeb L. R., Farinab M., Malm O., 2002. Hg localisation in *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), an atmospheric biomonitor. Atmospheric Environment 36 (2002) 881–887

Huidobro S. Ma. E., 2003. Micropropagación de *Tillandsia erubescens. var erubescens* Schltdl. (Bromeliaceae) : Multiplicación a partir de apices de tallo e influencia de la concentración de sacarosa en la germinación. Tesis que para obtener el grado académico de maestría en biología de recursos vegetales. FES-Iztacala, UNAM.

Moreno T., Venegas G., Zambrano S. y Vargas O., 2003. Epífitas vasculares como indicadores de regeneración en bosque intervenidos de la amazonia colombiana. Acta Biológica Colombiana, Vol. 8 No. 2, 2003 31

Frank J. H., Reenivasan S. S., Benschhoff P. J., Deyrup M. A., Edwards G. B., Halbert S. E., Hamon A. B., Lowman M. D., Mockford E. L., Scheffrahn R. H., Steck G. J., Thomas M. C., Walker T. J. and Welbourn W. C., 2004. Invertebrate animals extracted from native *Tillandsia* (Bromeliales: Bromeliaceae) in Sarasota country, Florida. *Florida Entomologist* 87(2)

Ospina B. F., Estevez V. J. V., Betancur J. & Realpe R. E., 2004. Estructura y composición de la comunidad de macro invertebrados acuáticos asociados a *Tillandsia tuneri baker* (Bromeliaceae) en un bosque alto andino colombiano. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 20(1): 153-166 (2004)

Srivastava D., 2006. Habitat structure, trophic structure and ecosystem function: interactive effects in a bromeliad-insect community. *Oecologia* 149: 493-504.

Wannaz E. D., Carreras H. A., Pérez C. A., Pignata M. L., 2006. Assessment of heavy metal accumulation in two species of *Tillandsia* in relation to atmospheric emission sources in Argentina. *Science of the Total Environment* 361 (2006) 267–278

Díaz E. J. A., 2007. Estudio exploratorio para el establecimiento del cultivo *in-vitro* de especies de helechos silvestres con potencial ornamental. TESIS de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Biotecnología.

Figueiredo A.M.G., Nogueira C.A., Saiki M., Milian F.M. y Domingos M., 2007. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of Sao Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor. *Environmental Pollution* 145 (2007) 279e292

Miranda J., 2007. Bromelias Ornamentales. Colección Manejo campesino de Recursos naturales. Bases para el manejo comunitario de Bromelias ornamentales. ISBN-13 978-968-9496-00-7 México

Mansilla M. J. R., 2007. Propagación *in-vivo e in-vitro* de especies del género *Tillandsia* (Bromeliaceae) en el vivero Clavela del aire, S. A. aldea Sajcavilla, San Juan Sacatepeques, Guatemala. Tesis que para obtener el título de Ingeniero agrónomo en sistemas de producción Agrícola. Universidad de San Carlos. Guatemala.

Stefano M., Papini A. y Brighigna L., 2007. A new quantitative classification of ecological types in the bromeliad genus *Tillandsia* (Bromeliaceae) based on trichomes. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 56 (1): 191-203, March 2007

Ceja R. J., Espejo S. A., López F. A. R., García C. J., Mendoza R. A. y Pérez G. B., 2008. Las plantas epifitas su diversidad e importancia. Ciencias. México. 91 julio-septiembre 2008.

Delia F. M. A. 2008. Diversidad de macro artrópodos en *Tillandsia carlos-hankii* Matuda y *Tillandsia oaxacana* L. B. Smith en un bosque de encino pino de Oaxaca. TESIS de maestría. Instituto politécnico Nacional. México.

Ospina B. F., Estevez V. J. V., Realpe E. y Gast F., 2008. Diversidad de invertebrados acuáticos asociados a Bromeliaceae en un bosque de montaña. 2R2ev4ista Colombiana de Entomología 34 (2): 224-229 (2008)

Pardo A., Michelangeli C., Mogollon N. y Alvarado G., 2008. Boletín del centro de investigaciones biológicas. Volumen 42, No. 4, 2008, PP. 491-505 Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela

Azofeifa Á., 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in-vitro*. Agronomía Mesoamericana, Vol. 20, Núm. 1, enero-julio, 2009, pp. 153-175 Universidad de Costa Rica. Costa Rica

Berdegal P., Mendoza P., Ubillús M., Torres B., Hurtado J., Maza I. y Espinoza R., 2009. El uso de *Usnea sp.* y *Tillandsia capilaris*, como biomonitores de la contaminación de ambiental en la ciudad de Lima, Perú Rev Soc Quím Perú. 75 (4) 2009

Luciani G. y Galdeano E., 2010. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. 2010. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia

CONABIO, 2010. El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible. 2010. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México septiembre de 2010

Mroginski L., Sansberro P. y Flaschland E., 2010. Cultivo de tejidos. En: Biotecnología y mejoramiento II. (ed). Argendio, INTA. Centro Internacional de Agricultura Tropical. pp (paginas totales del capitulo) Colombia

Papini A., Tani G., Di Falco P., Brighigna L.. 2010. The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. Flora 205 (2010) 94-100

Vargas C., Abdelnour E., 2010 Cultivo *in vitro* de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) apartir de embriones cigóticos. agronomía mesoamericana 21(1):73-83. 2010

Véliz M., 2010. Guía de reconocimiento del genero *Tillandsia* de Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas-CONAP. 2010

Villaseñor J. L., 2010. El bosque húmedo de montaña en México y sus plantas vasculares. Catalogo Florístico-Taxonomico. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Botánica.

Hernández Y. y González M. E., 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in-vitro* de frutales perenes. Cultivos Tropicales, 2010, vol. 31, no. 4, p. 58-69

Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L., 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.

Aguilera A. A., Isaza G. G., 2011. Diversidad y abundancia de la artropofauna en bromelias de bosques de manglar de la bahía de Buenaventura (Valle, Colombia). Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 12(1):1-11, 2011

Ballesteros P. G. A., Casimiro A. A., Zavala H. F., Tovar S. H. M. y Rodríguez P. L. A., 2011. Manual de practicas de Fisiología Vegetal. Instituto Tecnológico de la ciudad de Altamirano Editorial Trillas

Mondragón C. D. M., Ramírez M. I. M., Flores C. M., García F. J. G., 2011. La familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo

Horun L. C. T., 2011. Avances sobre Usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10 (4): 297 - 314ISSN 0717 7917

Trujillo G. R., Martínez R. G., Beltrán H. R. I. y Alexander C., 2011. Biomonitorin of micronutrients in *Tillandsia* sp. In the mining region of Zimapán, México. Simposio Iberoamericano Multidisciplinario de Ciencias e Ingenierías 2011 Pachuca. México.

Sosa L. D., Chávez S. J. L., Mondragón C. D., Estrada G. J. A. y Ramírez V. P., 2012. Viabilidad y germinación de semillas de seis especies de *Tillandsia* (BROMELIACEAE) de Oaxaca, México Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (Núm. Especial 5): 37 - 42, 2012

Díaz S. V., Molina B. B. A.; Romero E. V. y Palacios A. F., 2013. Factores que afectan la germinación de semillas en bromelias epífitas y consideraciones para su aprovechamiento.

Mansilla M. J. R., 2013. Propagación *in-vivo* e *in-vitro* de especies del genero *Tillandsia* (Bromeliaceae) en el vivero Clavela del aire, S. A. aldea Sajcavillá, Trabajo de graduación. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de agronomia.

Vázquez H. N. B., García N. J. R., Flores C. M., Koch O. S. D., Robledo P. A., 2014. Germinación y viabilidad de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* (Bromeliaceae) con fines de Aprovechamiento sustentable. *Ciencia y Tecnol. Agrop. México* Vol. 2, Núm. 1: 30-35 (2014)

Manual de Grupo Anthura y Bureau IMAC Bleiswijk B.V. Directrices para el cultivo de las Bromelias. (Manual digital).