



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

“Germinación y propagación de *Tillandsia  
macdougallii* L. B Sm. y *Tillandsia violacea*  
Baker (Bromeliaceae) con fines de  
aprovechamiento sustentable”

NORA BERENICE VAZQUEZ HURTADO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

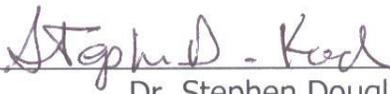
La presente tesis titulada: "Germinación y propagación de *Tillandsia macdougallii* L. B.Sm. y *Tillandsia violacea* Baker (Bromeliaceae) con fines de aprovechamiento sustentable", realizada por la alumna: NORA BERENICE VAZQUEZ HURTADO bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Stephen Douglas Koch

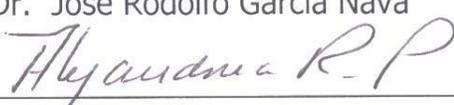
DIRECTORA DE TESIS

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Flores Cruz

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Rodolfo García Nava

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Alejandrina Robledo Paz

**GERMINACIÓN Y PROPAGACION DE *Tillandsia macdougallii* L. B. Sm. Y  
*Tillandsia violacea* Baker (BROMELIACEAE) CON FINES DE APROVECHAMIENTO  
SUSTENTABLE**

**NORA BERENICE VÁZQUEZ HURTADO M. C.**

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2014**

Los procesos sustentables son adoptados con mayor frecuencia por comunidades rurales de México. La conveniencia de conservar y aprovechar de una forma sostenible los recursos naturales, especialmente las bromelias (con potencial ornamental), pueden generar opciones y beneficios para las familias. Como una opción para evitar el saqueo, así como contribuir al manejo y protección, de las bromelias. En esta investigación se plantearon los siguientes objetivos: 1) se evaluó el porcentaje de germinación y viabilidad en las semillas de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea*, 2) se probó el efecto de los tratamientos pregerminativos, AG<sub>3</sub> y NKO<sub>3</sub> en la germinación y desarrollo de plántulas, 3) se estudiaron los efectos de diferentes sustratos para el establecimiento de plántulas y 4) se planteó la micropropagación *in vitro* como un método de propagación masiva. En la especie *T. macdougallii* (loc. "Las Juntas") se presentaron los mejores porcentajes de germinación (98 %) y 72 % de viabilidad, a diferencia de las semillas de *T. violacea* que presentaron (13 %) y 10 % respectivamente. En los tratamientos pregerminativo *T. macdougallii* se obtuvo un incremento del 57.5 % (testigo) a 87.2 % bajo el efecto de AG<sub>3</sub>, y el tratamiento que tuvo efecto en cuanto al incremento en tamaño de plántula, fue el NKO<sub>3</sub>. Para el establecimiento de plántulas se encontró que en el sustrato Fibra de coco- vermiculita (3:1) (en Cámara de ambiente controlado 20 °C), el 53 % de las plántulas sobrevivieron por 336 días. En cuanto a la micropropagación *in vitro*, el mayor porcentaje de germinación (90 %) y sobrevivencia (22 %) ocurrió en el medio MS al 50 %. El medio en el que se desarrolló un mayor número de hojas (9 por plántula) fue el MTDZ y el medio que permitió el mayor porcentaje de brotes adventicios fue el medio MA (52 %). Este estudio permitió elegir a la especie *Tillandsia macdougallii* como una especie posible para propagar y comercializar dentro de las comunidades agrestes del Estado de México.

**Palabras clave:** Germinación, viabilidad, sustratos, micropropagación, sobrevivencia

## ABSTRACT

The sustainable processes are adopted more often by rural communities in Mexico. The convenience of conserve and uses sustainable y the natural resources, especially bromeliads (with ornamental potential) can generate options and benefits for families. This research raised the following objective: 1) was proved the percentage of germination and viability in seeds *Tillandsia macdougallii* and *Tillandsia violacea*, 2) Was tested the effect of pregermination treatments,  $AG_3$  and  $NKO_3$  on germination and seedling development, 3) the effects of different substrates for cultivation and 4) the *in vitro* micropropagation was raised as a method of mass propagation. In the species *T. macdougallii* (loc. "Las Juntas") they were presented best germination (98 %) and 72 % viability *T. violacea* seeds presenting (13 %) and 10 % unlike. In *T. macdougallii* pregerminative treatments an increase of 57.5 % (control) to 87.2 % under the effect of  $GA_3$ , and the treatment had an increase in seedling size was obtained  $NKO_3$ . For the establishment of seedlings were found in the substrate fiber coconut–vermiculite (controlled environment chamber 20 °C), 53 % of seedlings survived for 336 days. Regarding the *in vitro* micropropagation, higher germination percentage (90 %) and survival (22 %) occurred in 50 % MS medium. The medium in which a greater number of leaves (9 per seedling) was developed and was MTDZ medium allowed the highest percentage of adventitious buds was the average MA (52 %). This study allowed the species to choose *Tillandsia macdougallii* as possible to propagate and market the rugged communities within the Estado de Mexico species.

**Keywords:** Germination, viability, substrates, micropropagation, survival

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca que me permitió formarme como M. C.

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme ser parte de esta prestigiada institución y me condescendió realizar mis estudios de maestría.

Al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos SINAREFI-SAGARPA, por financiar parte de la investigación.

Al Dr. Stephen Douglas Koch, mi consejero, gracias por su apoyo, disposición y paciencia, por compartir sus conocimientos y experiencia.

A la Dra. María Flores Cruz por impulsarme a realizar mis estudios en el Colegio de Postgraduados y apoyarme en muchos aspectos de mi vida, por encaminarme profesional y laboralmente, gracias por enseñarme sobre las bellas bromelias y sobre todo por permitirme ser parte de su vida y de este gran proyecto que me apasiona.

Al Dr. Rodolfo García Nava por compartir sus conocimientos, asesorarme y darme todas sus recomendaciones y sugerencia para realizar esta investigación y sobre todo por siempre estar dispuesto a ayudarme, gracias

A la Dra. Alejandrina por su asesoría y compartir sus conocimientos sobre el cultivo *in vitro*. Sin su ayuda no hubiera sido posible entender este tema completamente nuevo para mí.

Agradezco al M. C. Adrian Hernández Livera por asesorarme en la parte de germinación y tratamientos pregerminativos y por permitirme trabajar y brindarme un espacio en el laboratorio de análisis de semillas.

Al técnico Juan Herrera por auxiliarme en el laboratorio de Análisis de semillas, por su apoyo y buena disposición.

Al Dr. Trejo, a la Dra. Cecilia Peña, al Dr Rodolfo García por permitirme trabajar en las instalaciones del Laboratorio de Biofísica y Fisiología Vegetal Ambiental,

A la M.C. Ana Galicia, encargada del laboratorio que me facilito el equipo y material para trabajar en mi investigación.

Al personal técnico de cámaras de ambiente controlado, Álvaro Díaz, Sabino Sánchez y Telésforo Sánchez por auxiliarme con mis plantas y sobre todo por su valiosa amistad.

Al Sr. Justino Meraz por brindarme un espacio en los invernaderos de Botánica.

Al M. C. Toño por facilitarme material y por permitirme hacer uso de las estufas que me ayudaron a llevar a cabo mi investigación.

A la Sra. Silvia que me ayudo en el laboratorio de Biotecnología de Semillas, por auxiliarme y sobre todo por su gran disposición.

A la M.C. Josefina Jimarez Montiel, por compartir sus conocimientos en la caracterización de los sustratos y sobre todo por ser mi gran amiga y compañera durante este trayecto.

A mis grandes amigas Gabriela Rodríguez, Anayeli Salazar, Angélica Sánchez, Betzaida Jiménez, Sandra Salazar, Fabiola Trigueros, Sabina Carvente, Sandra Calzada, Luz, que a pesar del tiempo y la distancia siempre están ahí para darme ánimos y compartir tantas cosas bonitas conmigo.

A todas las personas que me ayudaron y que me apoyaron en esta etapa de mi vida, infinitas gracias...

*A mis padres Victoria y Aurelio, por todo su amor, cariño y apoyo, sin ellos no habría sido posible llegar hasta donde estoy, gracias.*

*Los amo*

*A mi hermana Brenda, a su esposo Julio y a mi pequeño travieso Ian Samuel, por su amor y gran apoyo en este camino,*

*Los quiero mucho*

## Contenido

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1 Literatura citada .....	5
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Descripción del género <i>Tillandsia</i> .....	6
2.2 Descripción de las especies <i>Tillandsia macdougallii</i> y <i>Tillandsia violacea</i> .....	7
2.3 Reproducción del género <i>Tillandsia</i> .....	9
2.3.1 Reproducción sexual.....	9
2.3.2 Reproducción asexual.....	10
2.4 Características de la germinación de semillas del género <i>Tillandsia</i> .....	11
2.5 Técnicas y sustratos utilizados para la producción de plantas del género <i>Tillandsia</i> .....	11
2.5.1 Vástagos o hijuelos .....	12
2.5.2. Cultivo de tejidos.....	13
2.6 Tratamientos para incrementar la germinación de semillas .....	14
2.7 Literatura citada .....	15
CAPITULO III. PRUEBAS DE VIABILIDAD Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE <i>Tillandsia macdougallii</i> L. B. Sm. y <i>Tillandsia violacea</i> Baker (Bromeliaceae) .....	17
3.1 Resumen.....	17
3.2 Abstract.....	18
3.3 Introducción .....	19
3.4 Materiales y métodos.....	21
3.5 Resultados .....	24
3.6 Discusión .....	28
3.7 Conclusiones .....	30
3.8 Literatura citada .....	30
CAPITULO IV. TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS EN SEMILLAS DE <i>Tillandsia macdougallii</i> L. B. Sm. y <i>Tillandsia violacea</i> Baker (Bromeliaceae) .....	32
4.1 Resumen.....	32
4.2 Abstract.....	33

4.3	Introducción .....	34
4.4	Materiales y métodos .....	36
4.5	Resultados .....	38
4.6	Discusión .....	44
4.7	Conclusiones .....	46
4.8	Literatura citada .....	47
CAPITULO V. GERMINACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE <i>Tillandsia macdougallii</i> L. B. Sm. (Bromeliaceae) EN DIFERENTES SUSTRATOS .....		
5.1	Resumen.....	49
5.2	Abstract.....	50
5.3	Introducción .....	51
5.4	Materiales y métodos .....	53
5.5	Resultados .....	66
5.6	Discusión .....	100
5.7	Conclusiones .....	103
5.8	Literatura citada .....	103
CAPITULO VI. PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Tillandsia macdougallii</i> L. B. Sm. y <i>Tillandsia violacea</i> Baker (Bromeliaceae) .....		
6.1	Resumen.....	105
6.2	Abstract.....	106
6.3	Introducción .....	107
6.4	Materiales y métodos .....	109
6.6	Discusión .....	128
6.7	Conclusiones .....	130
6.8	Literatura citada .....	130
CAPITULO VII. DISCUSIÓN GENERAL .....		
7.1	Literatura citada .....	137

## LISTA DE CUADROS

	PAGINAS
<b>Cuadro 1.</b> Viabilidad <i>Tillandsia violacea</i> de la localidad “Dos aguas” n=50.....	25
<b>Cuadro 2.</b> Viabilidad de <i>Tillandsia macdougallii</i> , localidad “Las Juntas” n=50.....	25
<b>Cuadro 3.</b> Porcentaje de germinación de dos especies de <i>Tillandsia</i> proveniente se seis localidades del Estado de México n=100.....	27
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de varianza, porcentaje de germinación de semillas de tres plantas de <i>Tillandsia macdougallii</i> . LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	39
<b>Cuadro 5.</b> Comparación de medias para determinar porcentaje de germinación (PG %) por planta de <i>Tillandsia macdougallii</i> en diferentes tratamientos pregerminativos ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ), nitrato de potasio (NKO <sub>3</sub> ) y el testigo (agua destilada).....	39
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianza (ANOVA) de tamaño de plántula, LG=grados de libertad, SM=Cuma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	40
<b>Cuadro 7.</b> Comparación de medias de Tukey para <i>Tillandsia macdougallii</i> entre plantas y tratamientos con respecto a la altura (mm) de las plántulas.....	40
<b>Cuadro 8.</b> Tiempo de germinación para las especies <i>T. macdougallii</i> y <i>T. violacea</i> bajo tratamientos pregerminativos.....	42
<b>Cuadro 9.</b> Análisis de varianza para las localidades: “Dos aguas”, CICITEC-IPN y “Las Juntas”; LG=grados de libertad, SM=Cuma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	43
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias en porcentaje de germinación promedio, de las semillas de <i>T. macdougallii</i> y <i>T. violacea</i> después de aplicar los tratamientos pregerminativos n=100.....	44
<b>Cuadro 11.</b> Número de plántulas de semillas de tres plantas madre, sobre cuatro sustratos.....	57
<b>Cuadro 12.</b> Número de plántulas en los sustratos: vermiculita, piedra pómez, carbón y pet moss, considerando el riego con infusión, IPM= Infusión planta madre, AD= agua destilada.....	58
<b>Cuadro 13.</b> Mezclas de sustratos humedecidos con la proporción de agua a capacidad de campo.....	63

<b>Cuadro 14.</b> Distribución de las 100 semillas para cada uno de los sustratos; FC-V= fibra de coco –vermiculita (3:1); P-V= Perlita-Vermiculita (1:1); A= aserrín; R1-R5= repeticiones; °T=temperatura.....	64
<b>Cuadro 15.</b> Distribución de 100 semillas de la especie <i>T. macdougallii</i> sobre el sustrato; fibra de coco-vermiculita (3:1) con malla.....	66
<b>Cuadro 16.</b> Número de plántulas sobre los sustratos: S1=Hojas de pino y S2=Hojas de pino, pet moss y carbón.....	68
<b>Cuadro 17.</b> Análisis de varianza de 4 sustratos a los 7 días de sobrevivencia y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato; LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	68
<b>Cuadro 18.</b> Análisis de varianza para los parámetros evaluados por ambientes y sustratos a los 20 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	78
<b>Cuadro 19.</b> Análisis de varianza para los parámetros evaluados por ambientes y sustratos a los 80 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	79
<b>Cuadro 20.</b> Análisis de varianza para los parámetros evaluados por ambientes y sustratos a los 140 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	80
<b>Cuadro 21.</b> Análisis de varianza para los tres sustratos en cámara de ambiente controlado a 336 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	81
<b>Cuadro 22.</b> Supervivencia de plántulas para determinar el mejor sustrato entre ambientes, a los 20, 80, 140 y 336 días, en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C).....	82
<b>Cuadro 23.</b> Análisis de varianza para diámetro de la roseta de plántulas en los 3 sustratos (FC-V, P-V y Aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato a los 160 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	87

<b>Cuadro 24.</b> Análisis de varianza para altura de plántula en 3 sustratos (FC-V, P-V y Aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato a los 160 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	88
<b>Cuadro 25.</b> Análisis de varianza para diámetro de la roseta en 3 sustratos (FC-V, P-V y Aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato hasta los 336 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	89
<b>Cuadro 26.</b> Análisis de varianza para altura de plántula en los 3 sustratos (FC-V, P-V y Aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato a los 336 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	90
<b>Cuadro 27.</b> Análisis de varianza y pruebas de Tukey en el sustrato fibra de coco-vermiculita con malla para determinar el mejor ambiente (cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) a los 227 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.....	95
<b>Cuadro 28.</b> Características físicas de los sustratos: fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1) y aserrín.....	99
<b>Cuadro 29.</b> Porcentaje de sobrevivencia a los 60 y 80 días de <i>Tillandsia macdougallii</i> en tres concentraciones de sales basales MS (25, 50 y 100 %)......	120
<b>Cuadro 30.</b> Análisis de varianza para diámetro de roseta.....	127
<b>Cuadro 31.</b> Análisis de varianza para altura de plántula.....	127

## LISTA DE FIGURAS

	PAGINAS
<b>Figura 1.</b> <i>Tillandsia macdougallii</i> L. B. Sm.....	8
<b>Figura 2.</b> <i>Tillandsia violacea</i> Baker.....	9
<b>Figura 3.</b> Prueba de germinación de las especies <i>T. macdougallii</i> y <i>T. violacea</i> en cuarto de germinación.....	24
<b>Figura 4.</b> Semilla de <i>Tillandsia macdougallii</i> con embrión teñido (viable).....	26
<b>Figura 5.</b> Semillas de <i>Tillandsia macdougallii</i> a los 6 días de germinación, (con la región del hipocótilo de color verde).....	27
<b>Figura 6.</b> Cajas petri con semillas de <i>Tillandsia macdougallii</i> bajo tratamientos pregerminativos en cuarto de germinación (temperatura 30 ± 1 °C).....	38
<b>Figura 7.</b> Plántulas de <i>Tillandsia macdougallii</i> a los 30 días de evaluación en tratamientos pregerminativos (izquierda KNO <sub>3</sub> , centro AG <sub>3</sub> , derecha testigo).....	41
<b>Figura 8.</b> Sustratos con plántulas de <i>T. macdougallii</i> , de izquierda a derecha; carbón, pómez, vermiculita y pet moss.....	59
<b>Figura 9.</b> Cámara de ambiente controlado a temperatura de 20 °C (ambiente 1).....	59
<b>Figura 10.</b> Invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C (ambiente 2).....	60
<b>Figura 11.</b> Plántulas sobre los sustratos: fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1), Aserrín ( <i>Pinus ayacahuite</i> ), en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C).....	65
<b>Figura 12.</b> Plántulas de <i>T. macdougallii</i> en sustratos orgánicos, izquierda: mezcla de hojas de planta madre, pet moss y pino, sustrato totalmente contaminado derecha: mezcla de pino, pet moss y carbón sin sobrevivencia.....	67
<b>Figura 13.</b> Supervivencia de plántulas especie <i>Tillandsia macdougallii</i> (planta 1) en sustratos con dos tipos de riego: infusión y agua destilada, n=9,8 y 7.....	69
<b>Figura 14.</b> Supervivencia de plántulas, especie <i>Tillandsia macdougallii</i> (planta 2) en sustratos con dos tipos de riego: infusión y agua destilada, n=5.....	70
<b>Figura 15.</b> Supervivencia de <i>Tillandsia macdougallii</i> (planta 3) en sustratos con dos tipos de riego: infusión y agua destilada, n=9,8 y 7.....	71

**Figura 16.** Porcentaje de germinación a los 10 días después de la siembra, los sustratos evaluados fueron: fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1) y aserrín (*Pinus ayacahuite*), n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.....74

**Figura 17.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre fibra de coco –vermiculita (3:1), en el ambiente 1, CAC (cámara de ambiente controlado a 20 °C) la sobrevivencia se prolongó por 336 días y en el ambiente 2, (invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) la sobrevivencia fue de 140 días, n=100,  $\pm$ = barras de error estándar.....75

**Figura 18.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre el sustrato perlita-vermiculita, solo en el ambiente 1, CAC (cámara de ambiente controlado) la sobrevivencia se prolongó por 336 días y en el ambiente 2, (invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) la sobrevivencia fue de 140 días, n=100,  $\pm$ = barras de error estándar.....76

**Figura 19.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre aserrín de *Pinus ayacahuite*, solo en el ambiente 1, CAC (cámara de ambiente controlado) la sobrevivencia se prolongó por 336 días y en el ambiente 2, (invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) la sobrevivencia fue de 140 días, n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.....77

**Figura 20.** Porcentaje de sobrevivencia a los 140 días en los sustratos: FC-V=fibra de coco- vermiculita) (3:1), P-V=perlita-vermiculita(1:1) y aserrín (*Pinus ayacahuite*), n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.....77

**Figura 21.** Hojas totales (1-3) en fibra de coco-vermiculita (3:1), en este sustrato el mayor número de hojas se formó a partir de los 80 días, en CAC=cámara de ambiente controlado 20 °C e invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.....82

**Figura 22.** Hojas totales (1-3) en perlita-vermiculita (1:1), en este sustrato el mayor número de hojas se formó a partir de los 50 días CAC=cámara de ambiente controlado 20 °C y a los 80 días en invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.....83

<b>Figura 23.</b> Hojas totales (1-3) en Aserrín ( <i>Pinus ayacahuite</i> ), en este sustrato el mayor número de hojas se formó a los 80 días CAC=cámara de ambiente controlado a 20 °C y 65 días en el invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, n=100‡=barras de error estándar.....	83
<b>Figura 24.</b> Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato fibra de coco- vermiculita (FC-V) (3:1), n=100, ‡=barras de error estándar.....	84
<b>Figura 25.</b> Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato Perlita - Vermiculita (1:1), n=100, ‡=barras de error estándar.....	85
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato aserrín, n=100, ‡=barras de error estándar.....	86
<b>Figura 27.</b> Longitud promedio de plántulas de <i>Tillandsia macdougallii</i> por días y sustratos, FC-V= fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V= perlita-vermiculita (1:1), n=20.....	90
<b>Figura 28.</b> Promedio del diámetro de la roseta de <i>Tillandsia macdougallii</i> por días y sustratos, FC-V=fibra de coco (3:1), P-V= perlita-vermiculita (1:1), n=20.....	91
<b>Figura 29.</b> Sustratos (FC-V (3:1), P-V (1:1) y Aserrín) con plántulas de <i>Tillandsia macdougallii</i> en cámara de ambiente controlado (20 °C), a los 160 días de sobrevivencia.....	92
<b>Figura 30.</b> Sustratos (FC-V, P-V y Aserrín) con plántulas en ambiente de invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C), a los 160 días de sobrevivencia.....	93
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de germinación a los 10 días después de la siembra en sustrato fibra de coco –vermiculita (3:1) con MALLA n=100, ‡=barras de error estándar.....	94
<b>Figura 32.</b> Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de <i>Tillandsia macdougallii</i> sobre fibra de coco-vermiculita con malla, en CAC (cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) n=100, ‡=barras de error estándar.....	94
<b>Figura 33.</b> Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato fibra de coco-vermiculita 3:1 con malla, n=100, ‡=barras de error estándar.....	96

<b>Figura 34.</b> Resumen de Tukey, para altura y diámetro de roseta a los 140 días en los sustratos Fibra de coco-vermiculita (FC-V) (3:1), perlita-vermiculita (P-V) (1:1), aserrín y fibra de coco (FC-V) (3:1) con malla, $\pm$ =barras de error estándar. n=20.....	97
<b>Figura 35.</b> Plántulas en sustrato FC-V con malla, a los 160 días de sobrevivencia.....	98
<b>Figura 36.</b> Curvas de retención de humedad en FC-V=fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V= perlita-vermiculita (1:1) y aserrín.....	100
<b>Figura 37.</b> Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de <i>T. macdougallii</i> cultivadas en los medios MG=medio germinación, MT=medio de inducción de brotes adventicios y MB= medio de desarrollo, $\pm$ =barras de error estándar.....	113
<b>Figura 38.</b> Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de <i>T. violacea</i> cultivadas en los medios MG=medio germinación, MT=medio de inducción de brotes adventicio y MB=medio de desarrollo, $\pm$ =barras de error estándar.....	114
<b>Figura 39.</b> Porcentaje de hojas formadas en plántulas de <i>T. macdougallii</i> crecidas en los medios: MG=medio germinación (Sales MS 100%), MT= medio de inducción de brotes adventicios (1.25 mg L <sup>-1</sup> BA).....	115
<b>Figura 40.</b> Porcentaje de hojas formadas en plántulas de <i>T. violacea</i> crecidas en los medios: MG=medio germinación (Sales MS 100%), MT= medio de inducción de brotes adventicios (1.25 mg L <sup>-1</sup> BA).....	116
<b>Figura 41.</b> Porcentaje de sobrevivencia de 35 plántulas de <i>Tillandsia violacea</i> cultivadas en el medio MG=medio germinación (Sales MS 100%), durante 65 días, $\pm$ = barras de error estándar.....	118
<b>Figura 42.</b> Porcentaje de hojas desarrolladas en <i>T. violacea</i> durante 65 días de sobrevivencia, en medio de cultivo MG=medio germinación (Sales MS 100%).....	119
<b>Figura 43.</b> Porcentaje de germinación de las semillas de <i>T. macdougallii</i> después de 10 días de cultivarlas en los medios MS al 25%, 50% y 100% de su concentración original. n=50, $\pm$ =barras de error estándar.....	120
<b>Figura 44.</b> Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de <i>T. macdougallii</i> en tres concentraciones de MS (25, 50 y 100 %) y su posterior cultivo en los medios: <b>MA</b> =BAP 2mg L <sup>-1</sup> , ANA 0.1mg L <sup>-1</sup> , <b>MY</b> =BAP 2mg L <sup>-1</sup> , ANA 0.5mg L <sup>-1</sup> y <b>MTDZ</b> = 2mg L <sup>-1</sup> de thidiazuron. n=50.....	121
<b>Figura 45.</b> Porcentaje de hojas formadas en plántulas de <i>T. macdougallii</i> cultivadas en los medios MS 25%, 50% y 100% durante 30 días.....	122

**Figura 46.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. macdougallii* cultivadas en los medios MS 25%, 50% y 100% durante 60 días.....122

**Figura 47.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. macdougallii* cultivadas en los medios MS 25%, 50% y 100% durante 80 días.....123

**Figura 48.** Porcentaje de hojas desarrolladas por las plántula de *T. macdougallii* después de 100 días de cultivo en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, n=50.....124

**Figura 49.** Porcentaje de hojas desarrolladas por las plantas de *T. macdougallii* después de 140días de cultivo en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, n=150.....125

**Figura 50.** Porcentaje de hojas desarrolladas por plántulas de *T. macdougallii* después de 180 días de cultivo en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, n=150.....126

**Figura 51.** Porcentaje de plantas de *Tillandsia macdougallii* que formaron brotes después de 140 días de ser cultivadas en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, ‡=barras de error estándar.....127

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad se ha reconocido a nivel mundial la belleza de las plantas epífitas, y un gran número han sido adoptadas como plantas de ornato; sin embargo, es desconocido su manejo y técnicas eficientes de producción que permitan satisfacer el mercado local, este problema ha ocasionado que las plantas sean extraídas de su ambiente natural sin control. Por ello el aprovechamiento sustentable, es una alternativa que establece una estrecha vinculación entre el crecimiento económico, equidad social y protección del medio ambiente por esta razón es importante encaminar estrategias para el manejo sustentable de especies epífitas como las bromelias.

A nivel mundial la familia Bromeliaceae incluyen aproximadamente 56 géneros y 3086 especies (Luther, 2006). En México se reportan 18 géneros y 363 especies (Mondragón *et al.*, 2011). Su distribución está restringida a los trópicos, subtropicos y zonas secas o templadas de América con excepción de *Pitcairnia feliciana*, que se encuentra en el oeste de África. En América le encontramos distribuida desde el estado de Virginia en los Estados Unidos hasta Brasil (Smith y Downs, 1974). El género *Tillandsia* es el más grande de esta familia con más de 600 especies comprendidas en seis subgéneros (Ramírez *et al.*, 2004).

Las especies de la familia Bromeliaceae son de gran importancia en los ecosistemas debido a que ocupan un lugar muy importante en el ciclo de nutrientes y proveen de sitios para vivir a una gran diversidad de fauna como: insectos, ácaros, crustáceos,

moluscos incluso pequeños anfibios (Flores-Cruz, 1998; Mondragón, 2002). Otro gran número de ellas son valiosas económicamente, en México se consumen los frutos de la piña (*Ananas comosus*), se utilizan los forrajes de *Tillandsia prodigiosa*, y *Hechtia glomerata*, la pita (*Aechmea magdalenae*) como proveedora de fibras de alta calidad, las rosetas espinosas de la piñuela (*Bromelia pinguin*) como cercas vivas (Miranda *et al.*, 2007; Mondragón *et al.*, 2011) y varias especies de la familia como plantas ornamentales debido a sus formas y colores (Sandoval-Bucio, *et al.*, 2004).

En algunos estados de México, por ejemplo; en Chiapas varias especies del género *Tillandsia* son usadas con fines ceremoniales y ornamentales. Debido a ello las bromelias son colectadas de sus poblaciones naturales sin control (González-Espinosa *et al.*, 2005). Asimismo, en otras regiones de los estados de Veracruz y Oaxaca se comercializan plantas que en su mayoría provienen de poblaciones silvestres (Arellano, 2002).

En México existen pocos viveros que se dediquen a la producción intensiva de bromelias. El vivero Xcaret en la Riviera Maya en el estado de Quintana Roo obtienen plantas de Bélgica y Holanda, la mayoría de las especies que crecen en este lugar no son nativas del país. Un ejemplo de vivero rústico se encuentra en Santa Catarina Ixtepeji en la Sierra Juárez del estado de Oaxaca, en este vivero las mujeres se dedican a colectar las plantas epífitas que caen del hospedero, ellas montan las plantas en pedazos de ramas de encino las sujetan con alambre, también las siembran en macetas en una mezcla de carbón y hojarasca (Mondragón *et al.*, 2011).

Actualmente, no se dispone de datos sobre el comercio mundial de bromelias; no obstante, los centros productores más importantes para el año de 1995 fueron Europa, Estados Unidos y Bélgica. Así mismo, el comercio global de bromelias ornamentales va en aumento (Negrelle *et al.*, 2012).

Con el fin de establecer proyectos que pretendan utilizar los recursos naturales, se han formado algunas organizaciones como: el Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental (GAIA), el Proyecto UAM Sierra Nevada y la Red de Bromelias del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI), el cuál apoya investigaciones que se relacionan con el aprovechamiento sustentable de diversas especies cultivadas y silvestres, como es el caso de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* endémicas de México. Las especies citadas son poco conocidas y apreciadas por los pobladores. Es de suma importancia dar a conocer y generar una perspectiva sustentable sobre la utilización con fines comerciales de especies epífitas. Abordando el conjunto de cualidades ecológicas, económicas y culturales que representan. En las comunidades de los municipios de Tlalmanalco, Temascaltepec y Juchitepec del Estado de México, se llevó a cabo el muestreo de plantas con semilla.

### **Objetivo general**

Evaluar la calidad fisiológica de las semillas de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea*, para su establecimiento y propagación.

### **Objetivos Particulares**

- Determinar la viabilidad y capacidad de germinación de las semillas de *T. macdougallii* y *T. violacea* colectadas.

- Ensayar diferentes tratamientos pregerminativos en semillas de *T. macdougallii* y *T. violacea*.
- Evaluar diferentes sustratos para el establecimiento y crecimiento de las plántulas de *T. macdougallii* y *T. violacea*.
- Utilizar la técnica de cultivo de tejidos para acelerar crecimiento y/o formar brotes adventicios de *T. macdougallii* y *T. violacea*.

### **Hipótesis**

- La viabilidad y la capacidad de germinación de las dos especies del género *Tillandsia* será contrastante debido a que son semillas silvestres provenientes de diferentes sitios de colecta.
- El uso de tratamientos pregerminativos permitirán incrementar la germinación y el crecimiento en plántulas de *T. macdougallii* y *T. violacea*.
- Al menos un sustrato incrementara el tiempo de sobrevivencia de las especies *T. macdougallii* y *T. violacea*.
- Las técnicas de cultivo de tejidos permitirán acelerar el crecimiento, tiempo de sobrevivencia, y brotes adventicios de las dos especies en estudio.

## 1.1 Literatura citada

- Arellano, M. J. Las Bromeliaceae del Estado de Oaxaca: riqueza florística y potencial ornamental. Tesis para obtener el título de Ing. Agrónomo Especialista en Zonas Tropicales. Oaxaca, México Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), 2002.135p.
- Flores-Cruz, M. Flora Genérica de la familia Bromeliaceae en el Estado de México. Manual para la identificación de las especies de la familia Bromeliaceae presentes en el estado. Tesis de maestría. D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Ciencias, 1998.186p.
- González-Espinosa, M. N. Ramírez-Marcial & L. Ruiz-Montoya. 2005. Diversidad biológica en Chiapas. Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR. Chiapas, México. pp. 153-159.
- Luther, H. E. 2006. An alphabetical list of Bromeliad binomials. The Marine Selby Botanical Gardens. Sarasota, Florida, USA 7<sup>th</sup> edition. The Bromeliad Society International.124p.
- Miranda, M. J., J. M. Arellanos, B. A. Salazar, F. M. Hernández, R. C. Quero & L. S Pérez. 2007. Bases para el manejo comunitario de bromelias ornamentales. Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental (GAIA) A.C. Oaxaca, México. 112p.
- Mondragón, D. C. Dinámica poblacional de *Tillandsia brachycaulos* Schltdl. en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán. Yucatán México. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). 2002. 92p.
- Mondragón, D. C., I. Ramírez-Morillo, M. Flores-Cruz & J. Garcia-Franco. 2011. La familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México, México. 98p.
- Negrelle, R. R., D. Mitchell & A. Anacleto. 2012. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 34(1):91-100.
- Ramírez, M. I., G. C. Fernández-Concha & Chi May F. 2004. Guía ilustrada de las Bromeliaceae de la porción mexicana de la península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Yucatán, México. pp.15, 42.
- Sandoval-Bucio, E. N., M. Flores-Cruz & A. Martínez-Bernal. 2004. Bromelias útiles de México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. XLIX 49 (4): 100-115.
- Smith, L. B. & W. J. Downs.1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. Monograph.14(1): 1-658.

## CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Descripción del género *Tillandsia*

Las plantas de este género son epífitas, saxícolas, raramente terrestres. Su forma de vida es colonial o solitaria; sus hojas están distribuidas en forma arrosetada, agrupadas en un solo punto (fasciculadas) o distribuidas a lo largo de un tallo corto o ligeramente alargado, más largas o más cortas que las inflorescencias, el escapo es corto o alargado; las brácteas del escapo generalmente semejantes a las hojas. La inflorescencia es erecta, péndula o ascendente, de tipo simple o compuesta. Las flores son bisexuales con sépalos libres o adnatos; Los pétalos son libres de diferentes colores; blancos, guindas, lilas, morados, rosas y verdes, que una vez abiertas las flores permanece de uno a tres días sin signos de senescencia en condiciones naturales. Cuando las inflorescencias son grandes generalmente presentan numerosas flores y éstas van abriendo progresivamente y en sucesión lo cual permite disfrutarlas por dos, tres o más semanas. La coloración de las plantas depende principalmente de la especie o población, madurez y también a la intensidad de luz a la que ha sido expuesta, en su desarrollo la corola es tubular; los estambres son exsertos o insertos, con filamentos libres o adnatos; El ovario es súpero, el fruto es una cápsula con semillas que presentan apéndices plumosos (Flores-Cruz, 1998; Pardo, 2004, Diego-Escobar *et al.*, 2013).

A este género pertenece uno de los grupos más especializados, debido a que presentan depósitos de agua en las bases foliares y absorben agua de la atmósfera por medio de sus trócomas escamosos multicelulares que se expanden cuando hay

humedad en el ambiente. Los pelos peltados colapsan cuando se secan, permitiendo el intercambio gaseoso a través de los estomas pero reduciendo la pérdida de agua de la superficie de la planta (Heywood, 1985).

El género *Tillandsia* comprende aproximadamente 340 especies de los trópicos y subtrópicos del Nuevo Mundo. En México se reconocen alrededor de 170 especies de las cuales 106 son endémicas del país (Diego-Escobar, 2005).

## **2.2 Descripción de las especies *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea***

*Tillandsia macdougallii* L. B. Sm., es una especie endémica de México que se distribuye en los Estados de Durango, Guanajuato, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, en los municipios de Ixtapaluca, Axapusco, Juchitepec y Tlalmanalco del Estado de México y en la delegación Tlalpan del Distrito Federal (Flores-Cruz, 1998; Rzedowski, 2005).

*T. macdougallii* es una epífita que crece en bosque de pino, de pino-encino o de encino a una altitud 2450-3400 msnm. Es una especie epífita raramente rupícola que forma colonias con numerosos hijuelos; las hojas subcarnositas están dispuestas en rosetas y son de color cinéreo-verdosas, más cortas que la inflorescencia, presentan un escapo alargado y delgado, las brácteas se encuentran sobrepuestas unas de otras. La inflorescencia es simple de color rosa; los sépalos son verdes en la base y rosados hacia el ápice, los pétalos son blancos hacia la base y morados hacia el ápice. Los estambres son exsertos, los filamentos se encuentran retorcidos espiralmente y son de color blanco. El pistilo es más largo que los estambres. El estilo es de color blanco y el

estigma es morado. En la Figura 1 se aprecia una planta completa. (Flores-Cruz, 1998; Rzedowski, 2005).



**Figura 1.** *Tillandsia macdougallii* L. B. Sm.

*Tillandsia violacea* Baker, es una especie endémica de México, que se localiza en los estados de Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Chiapas, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Veracruz, en zonas del Distrito Federal (Huixquilucan y Contreras) y en algunos municipios del Estado de México (El Chico, Epazoyucan, Coacalco, Tlalmanalco y Amecameca) (Flores-Cruz, 1998;Rzedowski, 2005).

*Tillandsia violacea* es una epífita que crece en bosques húmedos de encino, bosque mesófilo y ocasionalmente en bosques de coníferas a una altitud 2450-2800 msnm.

Es una planta epífita raramente saxícola, forma colonias con numerosos hijuelos; las hojas están dispuestas en roseta y son de color verde, éstas son más cortas que la inflorescencia. El escapo es alargado, las brácteas del escapo son imbricadas; la inflorescencia es compuesta, péndula y de color rojo. Cada rama es una espiga complanada y perpendicular al eje de la inflorescencia; los sépalos son verde-amarillentos con el margen hialino, los pétalos son de color blanco hacia la base y

morados hacia el ápice. Los estambres son exsertos, de diferente longitud, los filamentos son blancos hacia la base y morados hacia el ápice. El pistilo es más largo que los estambres, el estilo es blanco hacia la base, morado hacia el ápice y el estigma es morado. En la Figura 2 se observa una planta completa de *T. violacea*.

Crece en los bosques de encino, pino y de pino-encino, a una altitud de 2600 msnm y florece de enero a junio (Flores-Cruz, 1998).



**Figura 2.** *Tillandsia violacea* Baker.

### **2.3 Reproducción del género *Tillandsia***

El género *Tillandsia* se propaga de forma sexual por semillas o asexual mediante la formación de hijuelos o vástagos.

La floración se lleva a cabo de la base al ápice de la inflorescencia. Se estima que el proceso de floración tiene un lapso de hasta cuatro meses como en *T. bourgaei*, *T. dugesii* y *T. macdougallii* entre otras (Flores-Cruz, 1998).

#### **2.3.1 Reproducción sexual**

La reproducción sexual es el método más eficaz para la propagación y es efectiva por la gran cantidad de semillas del fruto (cápsula). Se ha estimado que tan solo una

cápsula puede producir entre 100 a 150 plántulas del total de semillas dependiendo de la especie, sin embargo mediante este proceso toma varios años para obtener una planta madura (Rauh, 1979).

Las especies del género *Tillandsia* producen gran cantidad de néctar por lo que la mayoría de las flores tienen características ornitófilas (Flores-Cruz, 1998). Beutelspacher (1999) menciona que aves como colibríes visitan flores de *Tillandsia bourgei* Baker y de *Pitcairnia chiapensis* Miranda.

Las flores de *Tillandsia* al ser de colores llamativos y de forma tubular, con los estambres expuestos permiten ser tocados por la cabeza del colibrí, al introducir el pico para tomar el néctar, así el polen es llevado a otras flores (Beutelspacher, 1999; Miranda *et al.*, 2007).

### **2.3.2 Reproducción asexual**

La multiplicación por vía asexual se da cuando la planta madre llega a la madurez, emite entre 4 y 8 hijuelos que emergen de la base, esto puede ocurrir antes, durante o después de la floración lo cual aumenta la probabilidad de sobrevivencia de la planta. Algunas especies producen una inflorescencia muy grande que consume gran parte de la energía en el momento de la producción de semillas, quedando incapacitadas totalmente para producir hijuelos, como es el caso de *Tillandsia utriculata* L. Otras especies además de producir hijuelos en la base y numerosas semillas, son también capaces de emitir hijos en los nudos de las inflorescencias maduras, como ocurre con la variedad vivípara de *Tillandsia flexuosa* Sw. Esta característica permite que a partir de una sola planta en poco tiempo se formen masas de plantas conectadas por los escapos de las inflorescencias viejas (Pardo, 2004).

## **2.4 Características de la germinación de semillas del género *Tillandsia***

Las especies de *Tillandsia* desarrollan cápsulas, cuando éstas maduran por completo, se abren liberando así las semillas. Una característica singular es la presencia de apéndices plumosos, distendidos en forma de paracaídas invertido que les permite ser transportadas por el viento a largas distancias. Estos apéndices plumosos (comas) almacenan agua y facilitan la germinación, además fungen como raíces en la primera etapa de la plántula. Cuando las semillas son transportadas por el viento y el coma se encuentra con una superficie rugosa (ramas, maderas, rocas, etc.), se adhieren a estas superficies donde las semillas quedan ancladas y sólo se da el proceso de germinación cuando se reúnen condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura, debido a esto solo un pequeño porcentaje del total de las semillas liberadas germina y da origen a una plántula. Después de 5 a 10 años dependiendo la especie, las plantas florecen, fructifican y mueren (Pardo, 2004; Miranda *et al.*, 2007).

## **2.5 Técnicas y sustratos utilizados para la producción de plantas del género *Tillandsia***

En la literatura se proponen distintas formas para propagar individuos por semillas. Algunas técnicas van desde usar cuerdas de cáñamo, bastidores con malla, bultos de hojas y ramas tiernas del hospedero, trozos madera, fibras sintéticas, sustratos comerciales entre otros (Toogood, 1999; Miranda *et al.*, 2007).

Para el uso de bastidores con malla, las semillas son proyectadas con un chorro de agua, las camas se mantienen en posición horizontal en un lugar sombreado y se

riegan diariamente. Cuando las semillas comienzan a germinar las camas se colocan verticalmente. Posteriormente cuando las semillas se convierten en plántulas con un tamaño de 3 cm, se cortan pequeños cuadros de la malla y se depositan en macetas con sustrato o se sujetan en troncos (Miranda *et al.*, 2007). Otra forma de soporte es utilizando bultos de 30 a 45 cm éstos se rellenan con ramas tiernas y hojas de conífera, colocando un poco de musgo, las ramas se doblan repetidas veces y se sujetan con rafia o alambre. Posteriormente, las semillas se esparcen y se sujetan con alambre más delgado de manera que queden expuestas a la luz, el bulto se humedece con agua de lluvia utilizando un atomizador y se colocan en un lugar sombreado (Toogood, 1999). En el método de la cuerda las semillas se colocan en cuerdas de cáñamo de 30 a 60 cm de largo, según el tamaño de las semillas, después se atan los extremos para evitar que se destrencen, las cuerdas se sumergen en agua hasta empapar y luego se deja drenar, se colocan las semillas y la soga se cuelga de manera vertical bajo malla sombra al 50 %, la cuerda se riega a diario solo con atomizador (Phillips, 1980).

### **2.5.1 Vástagos o hijuelos**

En el caso de la propagación vegetativa (asexual) la mayoría de las bromelias aseguran la supervivencia formando una gran cantidad de hijuelos o vástagos. Los hijos se presentan antes o durante el periodo de floración pero en raros casos los hijos aparecen después, ya cuando la planta madre ha muerto. Para que los hijuelos puedan separarse, éstos deben alcanzar un tamaño al menos de 1/3 de la altura de la planta madre, se debe utilizar objetos filosos como cuchillos o tijeras limpios. Si los hijuelos

tienen raíces, éstos pueden ser inmediatamente plantados pero cuando no, es recomendable dejar cicatrizar la herida por unos días antes de hacerlo, con el fin de evitar su pudrición y asegurar su establecimiento. Es muy importante para obtener plantas de buena calidad que los hijuelos sean vigorosos, libres de plagas y enfermedades (Gutiérrez de la Rosa, 2007).

### 2.5.2 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos es una técnica que consiste en aislar una porción de la planta (explantes) al cual se le proporcionan condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Estas se mantienen bajo condiciones artificiales y permiten la producción de plantas que poseen todas las características de la planta madre (Roca and Mroginsk., 1991).

Existen estudios sobre la propagación *in vitro* de especies de la familia Bromeliaceae como *Vriesea reitzii*, especie con potencial ornamental, en vías de extinción. Se utilizaron explantes de hojas basales jóvenes de 6 semanas con un 90.6% de regeneración obteniendo 60 brotes adventicios por explante en un medio nutritivo de Murashigey Skoog (MS) (1962) suplementado con 20.0  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 1.0  $\mu\text{M}$  de 6-furfurilaminopurina (cinetina). Las plántulas con más de 3 cm de longitud se aclimataron teniendo una supervivencia del 90% después de 60 días (Alves *et al.*, 2006). Otro caso es el *Tillandsia eizii* la cual mostró un 40 % de regeneración lo que equivale a 2.5 brotes por explante en un medio Kundson (1951) con 2  $\text{mg L}^{-1}$  6-bencilaminopurina (BAP) (8.88  $\mu\text{M}$ ), 0.1  $\text{mg L}^{-1}$  ácido naftalenacético

(ANA) (0.54  $\mu\text{M}$ ) a las doce semanas de la siembra (Pickens *et al.*, 2006). Mansilla (2007) menciona que para obtener 22 brotes por explante se requiere adicionar al medio de cultivo MS, 1 mg L<sup>-1</sup> de (BAP) para la especie *Tillandsia caput-medusae* Morren.

La propagación *in vitro* es una técnica muy importante para la propagación de especies del género *Tillandsia* ya que permite incrementar el número de individuos para su aprovechamiento sustentable (Mondragón *et al.*, 2011)

## **2.6 Tratamientos para incrementar la germinación de semillas**

En las pruebas de germinación es frecuente encontrar semillas que no germinan aún cuando han absorbido agua, oxígeno y se encuentran en condiciones óptimas de temperatura, luz y humedad (Besnier 1989; Hartmann *et al.*, 1990; ISTA, 1996). Estas semillas requieren de un manejo especial que muchas veces incluyen un tratamiento pregerminativo, en el que se aplican algunos compuestos u hormonas para promover e incrementar la germinación.

El nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ) es una sal que se utiliza como una fuente de nitrógeno para los cultivos y también estimula la germinación (Harty *et al.*, 1983).

La presencia de hormonas en la semilla está relacionada con el crecimiento del embrión. El ácido giberélico es una hormona ampliamente utilizada en la aceleración y la germinación uniforme de varias especies.

El ácido giberélico ó giberelinas tienen un efecto estimulante en el proceso de germinación, movilizan las reservas del endospermo por la activación de enzimas hidrolíticas promoviendo la germinación. Niveles altos de ácido abscísico en relación a los niveles de ácido giberélico inhiben la germinación La aplicación de ácido giberélico a las semillas puede hacer desaparecer latencia y acelerar el proceso de germinación (Flores, 1997).

## 2.7 Literatura citada

- Alves, G. M., L. L. Dal Vesco & M. P. Guerra. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae* 110:204–207.
- Besnier, R. F. 1989. Semillas: Biología y Tecnología. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 637p.
- Beutelspacher, B. C. 1999. Bromeliáceas como ecosistemas: con especial referencia a *Aechmea bracteata* (Swartz) Griseb. Ed. Plaza y Valdés, S.A. de C. V., D. F. México 68p.
- Diego-Escobar, M. V. El Género *Tillandsia* (Bromeliaceae) en el Estado de Guerrero, México. Estado de México, México. Tesis de maestría en Botánica. Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos. 2005. 209p.
- Diego-Escobar M. V., M. Flores-Cruz y S. D. Koch. 2013. *Tillandsia* L. (Bromeliaceae). Flora de Guerrero Facultad de Ciencias, UNAM. 119 p.
- Flores-Cruz, M. Flora Genérica de la familia Bromeliaceae en el Estado de México. Manual para la identificación de las especies de la familia Bromeliaceae presentes en el estado. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. D.F. México. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 1998. 186p.
- Flores, Z. V. 1997. La tecnología de semillas forrajeras en Venezuela. I. Selección de especies y latencia. FONAIAP DIVULGA. Núm. 8. Venezuela. 2 p.
- Gutiérrez de la Rosa, A. 2007. La Familia Bromeliaceae generalidades y Cultivo. *Boletín de difusión de la Sociedad Mexicana de Cactología*. 3(3):1-8.
- Hartmann, T. H., D. E. Kester and T. F. Davies. 1990. Plant propagation principles and Practices. 5ta edition. Regents/Prentice Hall. Englewood Cliff, New Jersey, United States of America. 647p.

- Harty, R., J. A. A. Hopkinson, B. English & J. Alder. 1983. Germination, dormancy and longevity in stored seed of *Panicum maximum*. *Seed Science and Technology*. 11(2): 341-351.
- Heywood, V. H. 1985. Las plantas con flores. Editorial Reverté S. A. Barcelona, España. 292p
- International Seed Testing Association (ISTA). 1996. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 24, supplement. Zurich, Switzerland: ISTA. 335p.
- Mansilla, M. J. Propagación *in vivo* e *in vitro* de especies del género *Tillandsia* (Bromeliaceae) en el vivero Clavela del Aire, S.A. aldea Sajcavilla San Juan Sacatepequez, Guatemala. Guatemala. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. 2007. 99p.
- Miranda, M. J., J. M. Arellanos, B. A. Salazar, F. M. Hernández, R. C. Quero & L. S Pérez. 2007. Bases para el manejo comunitario de bromelias ornamentales. Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental (GAIA) A.C. Oaxaca, México. 112 p.
- Mondragón, D. C., I. Ramírez-Morillo, M. Flores-Cruz & J. Garcia-Franco. 2011. La familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México, México. 98p.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Pardo, A. I. 2004. Subgénero *Tillandsia* en Venezuela. Asociación Venezolana de Bromeliología (AVBRO) <http://avbro.atwebpages.com/AVBRO/paginas/articulo1.htm>
- Pickens, K., J. Wolf, J. Affolter & H. Wetzstein. 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *Society for in vitro Biology*. 42:348-353.
- Phillips, R. H. 1980. "Growing Bromeliads seed in Fiji". *Journal of the Bromeliad Society*. 5:32-36.
- Rauh, W. 1979. Bromeliads for Home, Garden and Green house. Blendford Press. London, England. 431p.
- Rzedowski, G. C. de J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2da. edición., 1ra reimpresión. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406p
- Roca, W. M. & L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. 970p.
- Toogood, A. 1999. Plant Propagation. DK Publishing. New York, United States of America. pp.172-174.

### **CAPITULO III. PRUEBAS DE VIABILIDAD Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Tillandsia macdougallii* L. B. Sm. y *Tillandsia violacea* Baker (Bromeliaceae)**

#### **3.1 Resumen**

*Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* son especies epífitas endémicas de México. Sus atractivos colores y notable belleza de las flores e inflorescencias, les confiere un gran potencial ornamental. No obstante, en los últimos años, las poblaciones naturales de estas especies, se han visto afectadas por el saqueo y la destrucción de su hábitat. Como una opción para evitar la extracción masiva, además, de contribuir a la diversificación del cultivo, manejo y protección de estas plantas, el estudio tuvo como objetivo, evaluar las pruebas de viabilidad y germinación. Las semillas de las especies en cuestión se colectaron de febrero a junio de 2011, en 5 localidades: 1) Reserva “Dos aguas” y 2) “Santo Tomas” del Municipio de Tlalmanalco; 3) “Plan de Vigas, Parada “Las Juntas”, Municipio de Temascaltepec 4) “Las manzanas” del Municipio de Temascaltepec y 5) en los alrededores del CICITEC-IPN, Municipio Juchitepec. La viabilidad se evaluó mediante la prueba de tetrazolio y la germinación fue sobre papel a temperatura de  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y luz constante. Para ambas pruebas los tratamientos se organizaron en un diseño completamente al azar, con 3 repeticiones de 50 semillas (viabilidad) y 5 repeticiones con 20 semillas (germinación). Se utilizó un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey. Hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las especies. *Tillandsia violacea* presentó el porcentaje más bajo de semillas viables (10 %) de la localidad “Dos aguas” y *T. macdougallii* los más altos (72 %) de la localidad “Las Juntas”. En cuanto a la germinación, *T. violacea* obtuvo un 13 % (“Dos aguas”) y 0 % para las localidades “Santo Tomas” y “Las manzanas”. La

germinación de semillas de *T. Macdougallii* fue de 98 % (localidad “Las Juntas”) y 84 % (localidad CICITEC-IPN) ( $P \leq 0.05$ ). Con el estudio realizado se estableció que la semilla de *Tillandsia macdougallii* tiene alta germinación y podría utilizarse para propagar y comercializar plantas, dentro de las comunidades agrestes del Estado de México.

**Palabras clave:** *T. macdougallii*, *T. violacea*, germinación, viabilidad

### 3.2 Abstract

*Tillandsia macdougallii* and *Tillandsia violacea* are epiphyte endemic species from Mexico. Their attractive colors and outstanding beauty of their flowers as well as their inflorescence give them great ornamental potential. Notwithstanding, for the last years, the natural populations of these species have been affected by robbery and the destruction of their habitat. The objective of this study is to evaluate the tests of viability and germination as an option to avoid the massive extraction apart from contributing to the diversification of growing, handling and protection of these plants. The seeds of the mentioned species were collected from February to June, 2011 in five places: 1) Reservoir “Dos Aguas” and 2) “Santo Tomas” in Tlalmanalco county 3) “Plan de Vigas”, parada “Las Juntas” in Temascaltepec county 4) “Las Manzanas” in Temascaltepec county and in 5) the surrounding area of CICITEC-IPN in Juchitepec county. The viability was evaluated with the Tetrazolium test and the germination was performed over paper at a temperature of  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  at constant light. In both tests, the treatments were organized on a totally random design, with 3 repetitions of 50 seeds (viability) and 5 repetitions with 20 seeds (germination). An analysis of variance and a comparison of

the Tukey test were used. There were significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among the species. *Tillandsia violacea* showed the lowest percentage of viable seeds (10 %) in “Dos Aguas” region and *Tillandsia macdougallii* showed the highest (72 %) in “Las Juntas” region. In relation to germination, *Tillandsia violacea* had 13 % of it in “Dos Aguas” and 0% in “Santo Tomas” and “Las Manzanas”. *Tillandsia macdougallii* got 98% in “Las Juntas” and 84 % in CICITEC-IPN ( $P \leq 0.05$ ). With this study, *Tillandsia macdougallii* is proposed as a possible species to be grown and commercialized in the rural areas in the State of Mexico.

Keywords: *T. macdougallii*, *T. violacea*, germination, viability

### 3.3 Introducción

El género *Tillandsia* comprende un grupo de especies que en su gran mayoría son epífitas. Los frutos se caracterizan por ser de tipo cápsula. Las semillas de estos frutos son pequeños y portan un apéndice plumoso llamado coma, que les permiten dispersarse a grandes distancias para su establecimiento en distintos microambientes, además de acumular agua e influir de esta manera en la imbibición de la semillas (Mondragón *et al.*, 2011). La germinación, se define en términos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos, como el proceso mediante el cual el embrión de la semilla adquiere la actividad metabólica necesaria para reiniciar el crecimiento y transcribir las porciones del programa genético que lo convertirán en una planta adulta. La capacidad de germinación de las semillas es la primera información requerida para el manejo y futuro aprovechamiento sustentable de especies silvestres (Camacho, 2011).

La ISTA (Asociación Internacional de Pruebas de Semillas) ha desarrollado reglas para evaluar la calidad física y fisiológica en diversas semillas agrícolas y silvestres. Entre las metodologías que se utilizan para evaluar la calidad fisiológica en semillas, se encuentran dos: la prueba de germinación estándar y la de viabilidad con tetrazolio (Besnier, 1989; ISTA, 1996).

La prueba de viabilidad se determina para conocer el estado inicial de las semillas, si éstas están vivas o presentan algún tipo de latencia. Existen esquemas basados en esta prueba para diversas especies que permiten evaluar de forma gráfica y visual la viabilidad de un lote de semillas en una muestra representativa (ISTA, 1996; Camacho, 2011).

En la prueba topográfica por tetrazolio se utiliza una solución incolora de la sal cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio como un indicador de varios procesos de reducción que ocurren en las células vivas. Luego que la solución de tetrazolio es embebida por la semilla, en las células vivas de los tejidos se lleva a cabo una reacción química de óxido-reducción en la cual participan las enzimas deshidrogenasas presentes en los tejidos vivos. En esta reacción, los protones hidrógeno liberados en el proceso de respiración reducen a la sal de tetrazolio a formazan. El formazan es una sustancia estable, de coloración rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas (áreas de color rojo o rosado), de las zonas muertas (de color blanco). La prueba de germinación determina el máximo potencial germinativo de un lote de semillas, las condiciones ambientales durante esta prueba son controladas para propiciar una

germinación regular rápida y completa dependiendo la especie a evaluar (Peretti, 1994; ISTA, 1996).

Para la familia Bromeliaceae aún no se han generado suficientes protocolos para evaluar la calidad física y fisiológica de las semillas; sin embargo, algunos estudios en otras especies han contribuido a la caracterización de las semillas de esta familia como: *Puya cryptantha* Cuatrec., *Puya trianae* Baker, *Puya raimondii* Harms, *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb., *Streptocalyx floribundus* (Mart. ex Schult. f.), *Encholirium Mart ex Schult. & Schultf*, *Dyckia Shult & Schult f.* *Ananas anassoides*, *T. prodigiosa*, *T. carlos-hankii*, *T. bourgaei*, *T. makoyana*, *T. fasciculata*, *T. violacea*. Las semillas de estas especies se han evaluado en diferentes condiciones de luz y temperatura para estimular el proceso germinación y conocer su viabilidad mediante las técnicas de tetrazolio y el uso de rayos X (Vadillo *et al.*, 2004; Pinheiro & Borguetti, 2003; Mora, 2007; Tarré, 2007, Sosa-Luría *et al.*, 2012).

Como parte de la caracterización fisiológica de especies silvestres se llevo a cabo la evaluación de viabilidad y germinación de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea*.

### **3.4 Materiales y métodos**

#### **Colecta de plantas y semillas**

En el periodo de febrero a junio de 2011, se colectaron plantas epífitas con cápsulas maduras e inmaduras de las especies *Tillandsia macdougallii* y *T. violacea* de 5 localidades: 1) Reserva “Dos aguas” San Rafael, Municipio de Tlalmanalco 2) “Santo Tomas” Municipio de Tlalmanalco; 3) “Plan de Vigas, Parada “Las Juntas”, Municipio

de Temascaltepec, 4) “Las manzanas” Municipio de Temascaltepec y 5) alrededores de CICITEC-IPN, Municipio Juchitepec, Estado de México.

Se visitó la localidad “Dos aguas” y “Rio cosamala” en distintas ocasiones en las fechas del 06, 19, 20 de febrero y 20 de junio de 2011. En esta localidad se colectaron plantas adultas de *Tillandsia violacea* con cápsulas en estado dehiscente y con las semillas totalmente expuestas. En las localidades de “Santo Tomas”, se colectaron tres plantas y en “Las Manzanas” una, todas en etapa adulta con cápsulas en proceso de maduración esto se dedujo debido a que se encontraban cerradas, húmedas y de color verde.

En el caso de la localidad “Las Juntas” se colectaron 4 plantas de *T. macdougallii* adultas con cápsulas maduras dehiscentes que presentaban las semillas expuestas y sin ningún daño.

En la localidad del CICITEC-IPN se colectaron 2 plantas adultas de *T. macdougallii* con cápsulas en estado dehiscente con las semillas expuestas.

Estas plantas se introdujeron en bolsas de polietileno y se trasladaron al Laboratorio.

### **Clasificación de semillas**

Las semillas se clasificaron manualmente y se seleccionaron de manera que no presentaran ningún daño físico provocado por insectos o por la presencia de hongos.

### **Almacenamiento de semillas**

Tres plantas de *T. violacea* con cápsulas sin abrir fue almacenada durante cinco meses a temperatura ambiente hasta que la cápsula lograra la dehiscencia. Las demás semillas fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización.

En el laboratorio de Análisis de Semillas del Campus Montecillo se realizaron las evaluaciones de calidad fisiológica de las semillas de *T. macdougallii* y *T. violacea*, las cuales consistieron en la prueba de viabilidad con cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (tetrazolio) y germinación sobre papel.

Para realizar la prueba de viabilidad y germinación se siguieron las normas de la ISTA (1996) con algunas modificaciones, debido a que aún no se encuentra registrado el protocolo para el género *Tillandsia* para las dos especies en estudio.

### **Prueba de viabilidad**

Se evaluaron dos especies *Tillandsia violacea* de la localidad, “Dos aguas” y *Tillandsia macdougallii* de la localidad, “Las Juntas” (debido a la presencia de semillas vanas al momento de la disección no se realizó la prueba en las demás localidades). Para esta prueba se tomaron 150 semillas de manera aleatoria por localidad y especie para hacer tres repeticiones de 50 semillas y se dejaron por 16 horas en agua, para permitir el ablandamiento de la testa. Se disectaron longitudinalmente, de modo que el embrión quedara expuesto para permitir la penetración del tetrazolio. Las semillas se sumergieron en solución de tetrazolio al 0.2 %, se mantuvieron en oscuridad a 30 °C, por 16 horas. Transcurrido este tiempo, las semillas se lavaron y se colocaron en cajas petri sobre papel filtro humedecido. Se evaluó cada una de las semillas bajo un microscopio estereoscópico (marca Zeiss 47 50 22), si el embrión se teñía de rojo completamente o presentaba pequeñas áreas sin teñir, se consideraba que la semilla era viable. Si el embrión no se teñía o si la coloración era rosa las semillas no eran viables.

### Prueba de germinación

Se tomaron 100 semillas de *T. violacea* (localidad “Dos aguas”) y 50 semillas de *T. macdougallii* (localidad “Las Juntas”), con las cuales se formaron 5 repeticiones de 20 semillas (*T. violacea*) y 10 semillas (*T. macdougallii*) respectivamente, (se utilizó un número distinto de semillas por la baja disponibilidad de semillas) mismas que se colocaron en cajas petri con papel filtro humedecido con 10 ml de agua. Las cajas se mantuvieron en un cuarto de germinación a luz constante 1090.30 lux y  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . La temperatura se registró cada hora con un data logger HOBO durante el periodo en el que la prueba se llevó a cabo (15 días) (Figuras 3). Para cada caja se registró el número y porcentaje de germinación.



**Figura 3.** Prueba de germinación de las especies *T. macdougallii* y *T. violacea* en cuarto de germinación.

### 3.5 Resultados

#### Prueba de viabilidad

No se realizó prueba de viabilidad en todas las localidades debido a que en las localidades: “Las manzanas”, y “Santo Tomas”, las semillas de *T. violacea* resultaron

vanas. Para la localidad de CICITEC-IPN Municipio Juchitepec, en la que se colectó la especie *T. macdougallii* el número de semillas fue limitado.

El porcentaje de viabilidad para la especie *Tillandsia violacea* de “Dos aguas” fue en promedio de 10 % (Figura 4) (Cuadro 1).

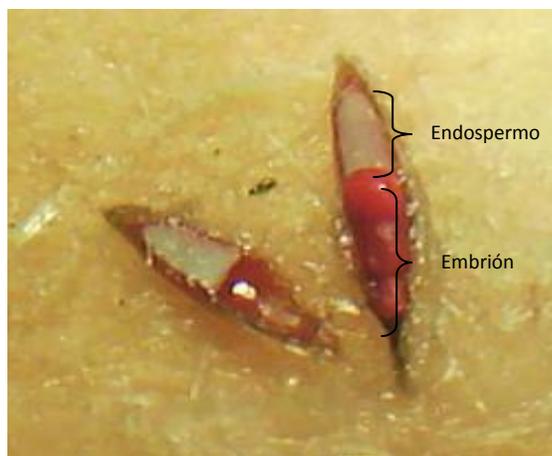
**Cuadro 1.** Viabilidad de semillas de *Tillandsia violacea*, localidad “Dos aguas” n=50.

<b><i>Tillandsia violacea</i> (porcentaje %)</b>		
<b>Repetición</b>	<b>Viables</b>	<b>No Viables</b>
<b>1</b>	16	84
<b>2</b>	4	96
<b>3</b>	10	90
<b>Promedio</b>	10	90

En contraste 72 % de las semillas de *Tillandsia macdougallii* localidad “Las Juntas” fueron viables (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Viabilidad de semillas de *Tillandsia macdougallii*, localidad “Las Juntas” n=50.

<b><i>Tillandsia macdougallii</i> (porcentaje %)</b>		
<b>Repetición</b>	<b>Viables</b>	<b>No Viables</b>
<b>1</b>	84	16
<b>2</b>	78	22
<b>3</b>	54	46
<b>Promedio</b>	72	28



**Figura 4.** Semilla de *Tillandsia macdougallii* con embrión teñido (viable).

Las características morfológicas de las semillas viables de estas dos especies son muy similares, presentan coma plumoso y testa café-rojiza; sin embargo, cuando las semillas son seniles o pierden viabilidad la testa se torna de color café oscuro o negro. En las semillas de *T. violacea* de las localidades “Las Manzanas” de Temascaltepec, “Dos Aguas” San Rafael y “Santo Tomas” de Tlalmanalco el coma de las semillas carecía de aspecto plumoso es decir, no tenía la misma apariencia del coma de las semillas viables de *T. macdougallii* por lo que es posible sea una característica importante para el éxito de la germinación de semillas de *Tillandsia*.

### **Prueba de germinación**

El mayor porcentaje de germinación se obtuvo para la especie *Tillandsia macdougallii* de la localidad “Las Juntas” con un 98 %, seguida de la localidad CICITEC-IPN (84 %). En contraste sólo el 13 % de las semillas de la especie *Tillandsia violacea* de la localidad “Dos aguas” germinaron, mientras que las semillas de las localidades de Santo Tomas y “Las Manzanas” no germinaron (Cuadro 3). Cabe mencionar que el

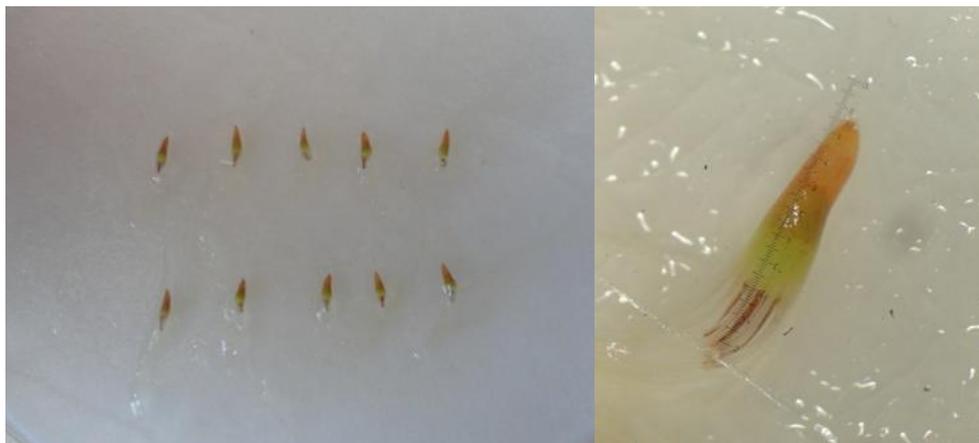
número total de semillas utilizadas por especie fue distinto para la prueba de germinación debido a la reducida disponibilidad de semilla.

**Cuadro 3.** Porcentaje de germinación de dos especies de *Tillandsia* proveniente se seis localidades del Estado de México n=100.

LAS JUNTAS	CICITEC-IPN	DOS AGUAS	SANTO TOMAS	LAS MANZANAS
<i>T. macdougallii</i>	<i>T. macdougallii</i>	<i>T. violacea</i>	<i>T. violacea</i>	<i>T. violacea</i>
98 %	84 %	13 %	0 %	0 %

El proceso de germinación inicia con la imbibición, cuando las semillas se encuentran en condiciones adecuadas de oxígeno, luz, temperatura y humedad. En tres días la región micropilar se torna de color verde en las semillas de *Tillandsia macdougallii* y a los 6 días se presenta la emergencia del hipocotilo (germinación). En el caso de *T. violacea* la región micropilar se torna de color verde a los 6 días y la germinación a los 11 días. Posteriormente a los 10 días el cotiledón da origen a la primera hoja (Figura 5).

Las semillas de *Tillandsia violacea* y *T. macdougallii*, son semillas fusiformes de color café-rojizo que presentan apéndices plumosos (coma) en la región micropilar.



**Figura 5.** Semillas de *Tillandsia macdougallii* los 6 días de germinación (con la región del hipocótilo de color verde).

### 3.6 Discusión

Una de las limitantes en la presente investigación fue la baja cantidad de individuos y semillas por población para ambas especies. Algunos de los factores que se infiere pudieron contribuir al escaso número de plantas y semillas colectadas fueron las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, luz etc.), la falta de polinizadores y los depredadores.

La viabilidad *Tillandsia macdougallii* y *T. violacea* presentó una marcada diferencia, mientras que en la primera el porcentaje promedio fue de 72 % en la segunda obtuvo solo un 10%. Esto se puede explicar posiblemente tomando en consideración las condiciones ambientales a las que estuvieron sometidas las semillas antes de ser colectadas, lo cual, coincide con lo que encontraron Vadillo *et al.*, (2004) para la especie *Puya raimondii* en la cual se obtuvo 41.85 % de viabilidad promedio en condiciones de temperatura ambiente de 21°C. Con este estudio se infiere que la importancia de los factores ambientales es primordial. Sin embargo, es notable que en la prueba de germinación para las semillas de *T. macdougallii* se obtuviera en promedio (91 %) (Cuadro 3). Esta diferencia entre la prueba de viabilidad y la de germinación podría deberse a falta de estandarización de la prueba de viabilidad para semillas de *Tillandsia*.

Se observó que el color de las semillas de *T. violacea* tiene cierta relación con la viabilidad, de esta forma las semillas de color café-rojizo eran viables, mientras las de color café oscuro o negras mostraban baja o nula viabilidad. El porcentaje de germinación (91 %) de *T. macdougallii* coincide con el de *T. brachycaulos* Schltdl. con 98 % de germinación (Mondragón & Calvo-Irabienl, 2006) a diferencia de *Puya*

*cryptantha* y *P. trianae*, quienes mantuvieron una viabilidad constante del 90 % durante un año, aunque con bajos porcentajes de germinación (31 %) debido a las condiciones poco propicias durante el almacenamiento como escasa humedad y ausencia de luz lo cual provocó latencia impuesta (Mora *et al.* 2007). El rango de temperatura en el que se llevó a cabo la germinación en *T. macdougallii* y *T. violacea* fue entre  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , esto coincide con lo reportado para *T. geminiflora* que aún almacenadas durante un año a temperatura ambiente las semillas mantuvieron un porcentaje de germinación del 76 % en un rango de 25 a  $30^\circ\text{C}$  (Oliveira *et al.*, 2005).

La germinación de *Tillandsia macdougallii* ocurrió entre los 6 y 7 días y para *T. violacea* a los 10 días mientras que para otras especies como *Aechmea bromeliifolia*, *A. castelnavii*, *Dyckia duckey* y *D. racemosa* este proceso inició a los 3 ó 4 días de la imbibición y ; en tanto que, para *Tillandsia adpressiflora* la germinación comenzó a los 8 días (Silva y Scatena, 2011).

En las especies epífitas de la familia Bromeliaceae a diferencia de las terrestres, no hay protrusión de radícula, lo que primero emerge es el hipocótilo siendo así la primera manifestación visible de la germinación (Cecchifordi *et al.*, 2001; Silva & Scatena, 2011). También en otras especies de la familia Bromeliaceae como *Vriesea heterostachys*, *Alcantarea imperialis*, *Vriesea penduliflora*, la germinación inicia por la aparición del hipocotilo en la región micropilar que posteriormente dará origen a la primera hoja de acuerdo a lo mencionado por Pereira (2009).

### 3.7 Conclusiones

Esta investigación estableció la metodología para evaluar calidad fisiológica de semillas de *Tillandsia macdougallii*, especie que presentó los mejores porcentajes de germinación y viabilidad. Además, se reconoce que la coloración clara de la testa (pardo y pardo-rojiza) son posiblemente indicadores de calidad de semilla. En cuanto a *T. violacea* la viabilidad y germinación fueron menores, por lo tanto se necesitan más estudios que determinen los factores que afectan la calidad de las semillas de esta especie.

### 3.8 Literatura citada

- Besnier, R. F. 1989. Semillas: Biología y Tecnología. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 637p.
- Camacho, M. F., 2011. Dormición de semillas: causas y tratamientos. 2da edición. Ed. Trillas. México, D. F. 232p.
- Cecchifiordi, A., Palandri M. R., Turicchia S., Tani G. & Di Falco Pietro. 2001. Characterization of the seed reserves in *Tillandsia* (Bromeliaceae) and ultrastructural aspects of their use at germination. *Caryologia*. 54(1):1-16
- ISTA. International Seed Testing Association. 1996. International Rules for Seed Testing. Rules 1996. Ed. ISTA, Zurich, Switzerland. 243p.
- Mondragón, D. C., I. Ramírez-Morillo; M. Flores-Cruz & J. García-Franco. 2011. La familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México, México. 98p.
- Mondragón, D. C. & I. Calvo-Irabien. 2006. Seed dispersal and germination of the epiphyte *Tillandsia brachycaulos* (bromeliaceae) in a tropical dry forest. *The Southwestern Naturalist*. 51(4):462-470

- Mora, F. H. A. Chaparro, O. Vargas & M. A. Bonilla. 2007. Dinámica de la Germinación, Latencia de Semillas y Reclutamiento de Plántulas en *Puya cryptantha* y *P. trianaea*, Dos Rosetas Gigantes de los Paramos Colombianos. *Ecotropicos*. 20(1):31-40.
- Oliveira, A. C.; D. J. Henriques da Silva; A. Americo-Cardoso; L. E. Ferreira Fontes; J. G. Barbosa. (2005). Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*. 27(1):165-170.
- Pereira, A. R. 2009. Comportamento germinativo de espécies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira. Botanica*. 32(4): 827-838.
- Peretti, A. 1994. Manual para análisis de semillas. Ed. Hemisferio Sur S. A. Uruguay. pp. 109-113.
- Pinheiro, F. y Borghetti F. 2003. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesebach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Shultes f.) Mez (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 17(1): 27-35.
- Silva, I. V. y Scatena V. L. 2011. Morfologia de sementes e de estádios iniciais de plântulas de espécies de Bromeliaceae da Amazônia. *Rodriguésia*. 62(2):263-272.
- Sosa-Luría, D., Chávez-Servia J. L., Mondragón-Chaparro D., Estrada-Gómez y Ramírez-Vallejo P. 2012. Viabilidad y Germinación de seis especies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35(5):37-42.
- Tarré, E., B. B. P. Mendes, A. P. G. Mancano, L. C. Alves, R. F. Campostrini & E. Mansur. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult.&Schult.f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 21(4):777-783
- Vadillo, G., M. Suni & A. Cano. 2004. Viabilidad y germinación de *Puya Raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*. 11(1):71-78.

## **CAPITULO IV. TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS EN SEMILLAS DE *Tillandsia macdougallii* L. B. Sm. y *Tillandsia violacea* Baker (Bromeliaceae)**

### **4.1 Resumen**

Los tratamientos pregerminativos se utilizan con el fin de promover y acelerar el proceso de germinación en semillas y en algunos casos el crecimiento en plántulas de diversas especies, silvestres o cultivadas. Se conoce muy poco sobre tratamientos pregerminativos aplicados a semillas de la familia Bromeliaceae. El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos compuestos, ácido giberélico ( $AG_3$ ) (0.01 %) y nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) (0.2 %) en *T. macdougallii* y *T. violacea*. Se realizaron dos experimentos: en el experimento 1 se utilizaron las semillas de tres plantas de *T. macdougallii* localidad “Las Juntas” y en el experimento 2, se evaluaron semillas de *T. violacea* de las localidades “Dos aguas” y “Santo Tomas” y semillas de *T. macdougallii* de las localidades “Las Juntas” y CICITEC-IPN. Para ambas pruebas los tratamientos se organizaron en un diseño completamente al azar con 4 repeticiones de 25 semillas (experimento 1) y 5 repeticiones de 10 semillas (experimento 2). Se utilizó el análisis de varianza y comparación de medias de Tukey. De acuerdo con los resultados del experimento 1, no se encontró diferencias significativas entre las plantas 1 y 2 ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, en la planta 3 si hubo diferencias ( $P \leq 0.05$ ), con el  $AG_3$  se obtuvo un 87.1% de germinación y con el testigo 57.5 %. Con respecto al tratamiento que promovió mayor crecimiento en plántulas de *T. macdougallii* fue el  $KNO_3$  (5.2 mm en promedio) a diferencia del testigo (4.3 mm en promedio). En el experimento 2, las

semillas de *T. violacea* de las localidades “Dos aguas” y “Santo Tomas” no germinaron bajo ningún tratamiento. Sin embargo, en las semillas de *T. macdougallii* de las localidades “Las juntas” y “CICITEC” mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre localidades. Las semillas que obtuvieron los porcentajes más altos de germinación con  $AG_3$  (95 %) fue de la localidad “Las Juntas”. Con este estudio se logro inferir el efecto positivo de los tratamientos pregerminativos con  $AG_3$  y  $KNO_3$  en las semillas de *T. macdougallii*, ya que lograron mejorar el porcentaje de germinación y crecimiento, a diferencia de lo que paso en las semillas de *T. violacea* que fueron poco viables y vanas.

**Palabras clave:** Tratamientos pregerminativos,  $AG_3$ ,  $KNO_3$ , germinación, crecimiento.

#### 4.2 Abstract

The pregerminative treatments are used to promote and accelerate the process of germination in seeds and in some cases the growing of seedlings of certain species, wild or farmed. There is little knowledge about pregerminative treatments applied to seeds of the Bromilaceae family. The objective of this study was to evaluate the effect of two chemical compounds, gibberellic acid ( $AG_3$ ) (0.01%) and potassium nitrate ( $KNO_3$ ) (0.2%) in *Tillandsia macdougallii* and *Tillandsia violacea*. Two experiments were performed: in experiment 1, 3 seeds of *Tillandsia macdougallii* plants from “Las Juntas” were used and in experiment 2, seeds of *Tillandsia violacea* from “Dos Aguas” and “Santo Tomas” as well as seeds of *Tillandsia macdougallii* from “Las Juntas” and CICITEC-IPN were used. In both tests, the treatments were organized in a completely random design with 4 repetitions of 25 seeds (experiment 1) and 5 repetitions of 10

seeds (experiment 2). An analysis of variance and a comparison of the test of Tukey were applied. According to the results of experiment 1, no significant differences were found between the plants 1 and 2 ( $P \geq 0.05$ ). However, there were differences in plant 3 ( $P \leq 0.05$ ), an 87.1 % of germination was obtained with  $AG_3$  and just a 57.5 % with the control. It was the  $KNO_3$  treatment that caused the highest growing of *Tillandsia macdougallii* seedlings (5.2mm in average) unlike with the control (4.3mm in average). In experiment 2, the *Tillandsia violacea* seeds from “Dos Aguas” and “Santo Tomas” did not germinate under any treatment. However, the *Tillandsia macdougallii* seeds from “Las Juntas” and CICITEC-IPN showed significant differences ( $P \leq 0.05$ ) among localities. The seeds from “Las Juntas” obtained the highest percentage of germination with  $AG_3$  (95 %). With this study, a positive effect of pregerminative treatments with  $AG_3$  and  $KNO_3$  in *Tillandsia macdougallii* seeds could be concluded because the percentage of germination and growing could be improved; on the contrary, *Tillandsia violacea* seeds were less viable and vain.

**Keywords:** Pregerminative, treatments,  $AG_3$ ,  $KNO_3$ , germination, growth

### 4.3 Introducción

Existen impedimentos por los cuales las semillas no llegan a germinar. Las características físicas y químicas que presenta la testa, como la impermeabilidad al agua y al oxígeno ha sido un factor limitante para la propagación de especies de importancia económica de la familia Bromeliaceae. Un ejemplo es el de *Bromelia balansae* Mez en la cual se han probado tratamientos de escarificación con agua

caliente y ácido sulfúrico con el fin de promover su germinación (Coelho *et al.*, 2011). Asimismo, las semillas pueden sufrir un proceso de deterioro natural que provoca la pérdida de vigor y viabilidad (Camacho, 2011).

Los tratamientos estimulantes de la germinación se utilizan con el fin de mejorar la germinación (Camacho, 2011). Entre los tratamientos que promueven el proceso de germinación en semillas y el crecimiento de las plántulas están la aplicación de fitohormonas como el ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) y de otros compuestos como el nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) (Ramos y Zavaleta, 1993).

El ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) es una hormona vegetal, relacionada con el desarrollo del embrión, y ha sido ampliamente utilizado para acelerar la germinación en diferentes especies. Shepley & Chang (1972) mencionan que esta hormona actúa en dos sitios de la semilla: el embrión y la capa de aleurona. Es producida internamente e interviene primero sobre el embrión, el que a su vez, sintetiza más giberelina, la cual se difunde a la capa de aleurona, en donde estimula la síntesis de amilasas e hidrolasas, las cuales descomponen las paredes celulares del endospermo e hidrolizan almidones y proteínas, liberando así los nutrientes y la energía necesaria para el desarrollo del embrión. Las giberelinas tienen este efecto estimulante en el proceso de germinación cuando se aplica a semillas con latencia.

Existen algunos estudios con bromelias, en los que se aplicó ácido giberélico para acelerar la germinación, tal es el caso de *Alcantarea imperialis* (Carrière) J.R. Grant en el que 5mg.L Promueve este proceso en un 73 % (Bonin *et al.*, 2010) y *Dyckia encholirioides* (Gaudich.) Mez, en una dosis baja (Pompell, 2006).

Otros estudios de germinación en semillas, aunque no propiamente de bromelias, sino de gramíneas o de hortalizas, han sido usados otros compuestos como el nitrato de potasio (0.2 %), siendo efectivo para superar la latencia. En diferentes especies de los géneros *Poa*, *Panicum*, *Paspalum*, *Festuca*, *Buchloe*, *Agrostis* y *Cichorium* se ha probado y se recomienda el uso del  $\text{KNO}_3$  (Popinigs, 1985).

Se propusieron tratamientos pregerminativos para mejorar el proceso de germinación, además de determinar el efecto del  $\text{AG}_3$  y  $\text{KNO}_3$  sobre el crecimiento de la roseta de *T. macdougallii*.

#### **4.4 Materiales y métodos**

Para realizar esta prueba se siguieron las normas de la ISTA (1996), en base a la concentración que se aplica en especies de la familia Poaceae.

##### **Primer experimento**

Se utilizaron semillas de tres plantas de *T. macdougallii* localidad "Las Juntas". El diseño experimental fue completamente al azar. Se tomaron 100 semillas por tratamiento y se dividieron en 4 repeticiones. Las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación, y altura de plántula.

Las semillas permanecieron por 30 días en cuarto de germinación a  $30 \pm 1$  °C y luz constante (Figura 6).

## **Segundo experimento**

Se evaluaron semillas de cuatro localidades 1) “Dos aguas”, 2) “Santo Tomas”, 3) “Las Juntas” y 4) CICITEC-IPN. El diseño experimental fue completamente al azar, se tomaron 50 semillas por tratamiento y se dividieron en 5 repeticiones por unidad experimental. Las variables a evaluar fueron: Porcentaje de germinación y sobrevivencia.

Las semillas permanecieron por 12 días en cuarto de germinación, a  $30 \pm 1$  °C y luz constante. Posteriormente se trasladaron a una cámara de ambiente controlado a 25°C con un fotoperiodo de 12 h.

### **Desinfección de semillas**

Las semillas se sumergieron en una solución fungicida a base de Rdomil® (Metalaxil clorotalonil) al 0.1 % por 20 minutos, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada; después se colocaron en una solución de cloro comercial (Cloralex®) al 20 % por 20 minutos, finalmente se lavaron dos veces con agua destilada estéril.

### **Tratamientos pregerminativos**

Las semillas según los tratamientos fueron colocadas en cajas petri con papel filtro y humedecidas con ácido giberélico ( $AG_3$ ) al 0.01 %, Nitrato de Potasio ( $KNO_3$ ) al 0.2 % y agua destilada (testigo).



**Figura 6.** Cajas petri con semillas de *Tillandsia macdougallii* bajo tratamientos pregerminativos en cuarto de germinación (temperatura  $30 \pm 1$  °C)

### **Evaluación de longitud de roseta**

Para determinar si los tratamientos ( $\text{KNO}_3$  y  $\text{AG}_3$ ) promovieron el crecimiento de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* se midió la altura de la roseta de 20 plántulas (20 repeticiones) de cada tratamiento.

Las plántulas se observaron y fotografiaron con un microscopio estereoscópico OLYMPUS modelo SZ2, y las imágenes se procesaron con el programa de Image-pro plus 7.0 para calcular la longitud de las plántulas.

## **4.5 Resultados**

### **Primer experimento**

Se evaluó el porcentaje de germinación por planta de *T. macdougallii* de la localidad “Las Juntas”. De acuerdo a los resultados no se encontró diferencias significativas entre el porcentaje de germinación de los tratamientos para las semillas de las plantas 1 y 2 ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, para la planta 3 si hubo diferencias significativas entre tratamientos, siendo el  $\text{AG}_3$  el mejor tratamiento ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 4 y 5).

**Cuadro 4.** Análisis de varianza, porcentaje de germinación de semillas de tres plantas de *Tillandsia macdougallii*. LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	114.93	57.47	0.3792	NS
Error	9	477.96	53.11		
Total	11	592.90			

Planta 1

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	44.99	22.50	0.4053	NS
Error	9	202.46	22.50		
Total	11	247.45			

Planta 2

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	1790.88	895.44	0.001	*
Error	9	215.42	23.94		
Total	11	2006.30			

Planta 3

**Cuadro 5.** Comparación de medias para determinar porcentaje de germinación (PG%) por planta de *Tillandsia macdougallii* en diferentes tratamientos pregerminativos; ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) y el testigo (agua destilada).

	Planta 1	Planta 2	Planta 3
Tratamiento	PG %	PG %	PG %
AG <sub>3</sub>	84.2 a	90.0 a	87.1 a
KNO <sub>3</sub>	81.3 a	90.0 a	76.3 b
Testigo	76.7 a	85.9 a	57.5 c

Separación de medias HDS de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales en cada columna.

De acuerdo con las pruebas de Tukey en la planta 3 se incrementó la germinación de 57.5 % a 87.1 % en AG<sub>3</sub>.

### Evaluación del crecimiento de la roseta en plántulas de *T. macdougallii*

Respecto a la altura de plántula entre plantas no hubo diferencias estadísticas significativas ( $P \geq 0.05$ ) (Cuadro 6). Sin embargo, si existieron diferencias significativas entre tratamientos pregerminativos ( $P \leq 0.05$ ) siendo el  $KNO_3$  el que promovió mayor crecimiento a los 30 días de crecimiento, en cuarto de germinación a  $30 \pm 1$  °C (Cuadro 6) (Figura 7).

**Cuadro 6.** Análisis de varianza (ANOVA) de tamaño de plántula, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

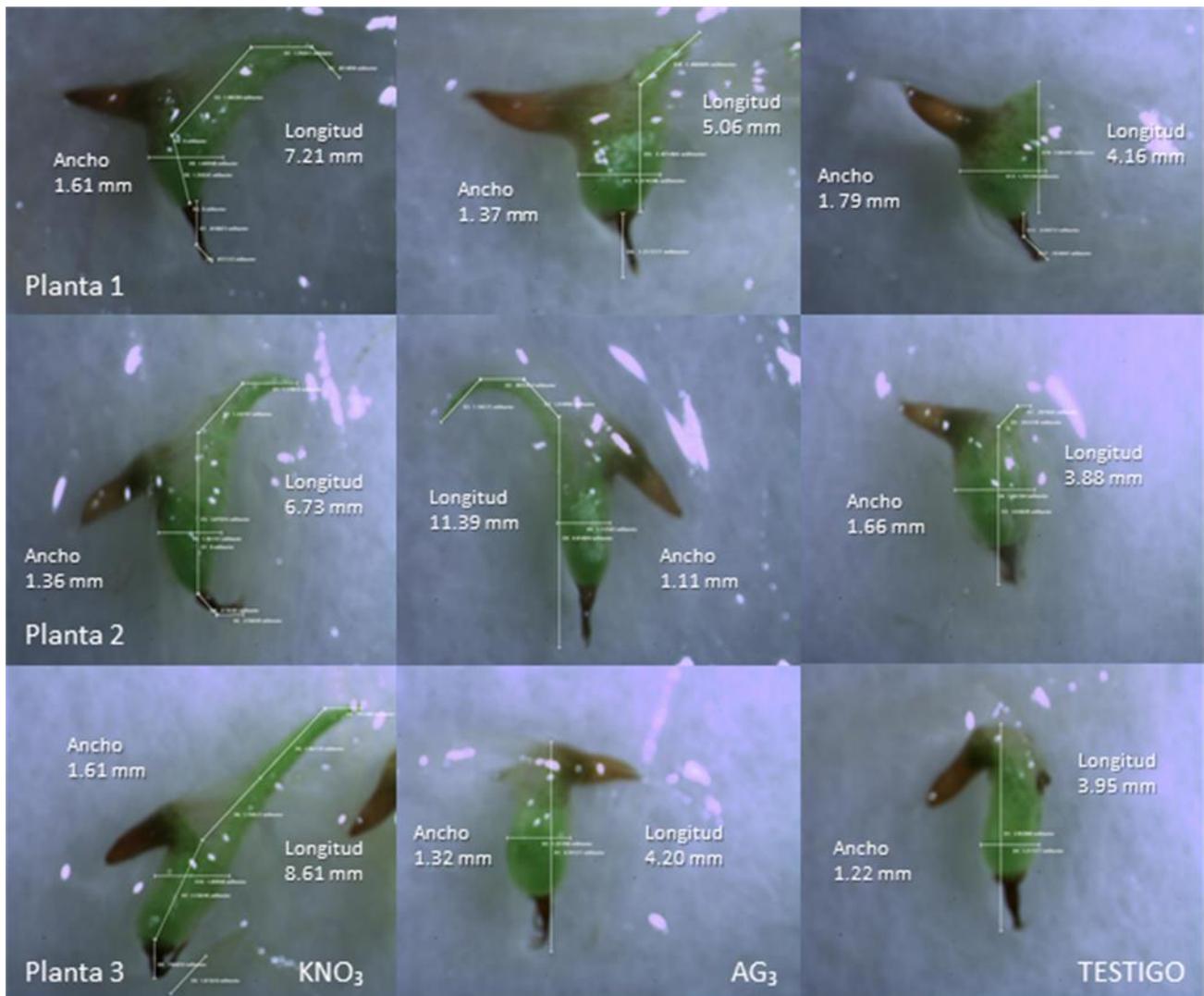
FV	GL	SC	CM	P	SIG
Planta	2	2.23	1.11	0.3589	NS
Tratamiento	2	25.62	12.81	<0.0001	*
Planta*Tratamiento	4	12.15	3.10	0.0246	*
Error	171	184.83	1.08		
Total	179	225.09			

**Cuadro 7.** Comparación de medias de Tukey para *Tillandsia macdougallii* entre plantas y tratamientos con respecto a la altura (mm) de las plántulas.

Plantas	Media(mm)	Tratamientos	Media (mm)
2	4.9 a	$KNO_3$	5.2 a
3	4.7 a	$AG_3$	4.7 b
1	4.6 a	Testigo	4.3 b

Separación de medias HDS de Tukey ( $P=0.05$ ) valores con la misma letra son estadísticamente iguales en cada columna.

De acuerdo con las pruebas de Tukey el  $KNO_3$  promovió mayor altura en las plántulas de *Tillandsia macdougallii*, con lo que se infiere que el tratamiento al proporcionar de elementos como nitrógeno y potasio proporcionaron un efecto positivo en el crecimiento de las plántulas.



**Figura 7.** Plántulas de *Tillandsia macdougallii* a los 30 días de evaluación en tratamientos pregerminativos (izquierda KNO<sub>3</sub>, centro AG<sub>3</sub>, derecha testigo).

## Segundo experimento

### Efecto de los tratamientos pregerminativos por localidades

Se evaluaron las semillas de cuatro localidades en las que se incluyen *Tillandsia macdougallii* y *T. violacea*. Las semillas que presentaron menor tiempo de germinación

fue la especie *T. macdougallii* a diferencia de *T. violacea* que tardo 5 días más en germinar (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Tiempo de germinación para las especies *T. macdougallii* y *T. violacea* bajo tratamientos pregerminativos.

Localidad	Especie	Tiempo de germinación
Dos aguas, Mpio. Tlalmanalco	<i>T. violacea</i>	11 días
Santo Tomas, Mpio. Tlalmanalco	<i>T. violacea</i>	No germinaron
Las Juntas, Mpio. Temascaltepec	<i>T. macdougallii</i>	6 días
CICITEC, Mpio. Juchitepec	<i>T. macdougallii</i>	7 días

De acuerdo con las pruebas de viabilidad que previamente se llevaron a cabo (capítulo 3) se encontró que algunas semillas tenían un nivel bajo de germinación como fue el caso de las de *T. violacea* de las localidades Dos aguas y Santo Tomas. Debido a esta condición sólo se evaluaron tres de las cuatro localidades.

El análisis de varianza mostró que para la localidad “Dos aguas” y CICITEC no hubo diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre los tratamientos. Sin embargo; para las semillas de la localidad “Las Juntas” la diferencia entre tratamientos fue significativo ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Análisis de varianza para las localidades: “Dos aguas”, CÍCITEC-IPN y “Las Juntas”; LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

“Dos aguas”

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	336.86	168.42	0.4475	NS
Error	12	2349.10	195.76		
Total	14	2685.96			

CÍCITEC-IPN

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	94.29	47.14	0.9522	NS
Error	12	11500.95	958.41		
Total	14	11595.23			

“Las Juntas”

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	1245.39	622.69	0.0025	*
Error	12	723.24	60.27		
Total	14	1968.63			

En el Cuadro 9, se observa que las semillas de la Localidad “Las Juntas” los tratamientos tuvieron efecto significativo en la germinación. Sin embargo; la especie que mostró los porcentajes de germinación más altos fue *T. macdougallii* de la localidad “Las Juntas”, el AG<sub>3</sub> elevó este porcentaje de germinación de 66.9 a 86.3 %, previamente las semillas presentaron un mayor porcentaje de viabilidad en la prueba de tetrazolio lo cual concuerda con los valores de germinación (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Comparación de medias en porcentaje de germinación promedio de las semillas de *T. macdougallii* y *T. violacea* después de aplicar los tratamientos pregerminativos n=100.

Loc. "Río Cosamala" <i>T. violacea</i>		Loc. "Las juntas" <i>T. macdougallii</i>		Loc. "CICITEC" <i>T. macdougallii</i>	
Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
Testigo	37.8 a	AG <sub>3</sub>	86.3 <sup>a</sup>	KNO <sub>3</sub>	31.2a
AG <sub>3</sub>	27.9 a	Testigo	86.3 <sup>a</sup>	Testigo	30.7a
KNO <sub>3</sub>	27.6 a	KNO <sub>3</sub>	66.9b	AG <sub>3</sub>	25.6a

Separación de medias HDS de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales en cada columna.

#### 4.6 Discusión

La germinación de las semillas tratadas con AG<sub>3</sub> fue mayor en la especie *Tillandsia macdougallii* (87.1 %) y el testigo presentó un porcentaje menor de 57.5 %. Esto coincide con lo reportado para la especie silvestre de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) en la cual el uso de AG<sub>3</sub> incrementó la germinación de 29 % a 32 % (Magnitskiy y Ligarreto, 2007). En el caso de *Alcantarea imperialis* (Carrière) J.R. Grant se ensayaron diferentes concentraciones de AG<sub>3</sub> (5, 10, 20, 40 y 80 mg·L<sup>-1</sup>) encontrándose que con 5mg·L<sup>-1</sup> se obtuvo la máxima germinación (73%) (Bonin *et al.*, 2010).

Es importante considerar que las semillas de *T. macdougallii* y *T. violacea* estuvieron sometidas a luz constante durante los primeros días de la imbibición, siendo este un factor elemental y recomendado en la germinación de especies del género *Tillandsia* (Vadillo *et al.*, 2004; Pinheiro & Borguetti, 2003; Mora, 2007; Tarré, 2007). Además el fotoperiodo influye en la síntesis de AG<sub>3</sub> y en los días largos (luz constante) se

incrementa dicha síntesis mejorando el proceso de germinación en algunas especies y en particular las que se estudiaron en este capítulo (Evert, 1992; Hernández *et al.*, 2009).

El color de las semillas es una característica que está relacionada con el bajo o nulo porcentaje de germinación. En el caso de *T. macdougallii* y *T. violacea* las semillas de color café oscuro o negro con testa rugosa y delgada, tuvieron poco efecto de los tratamientos. Esto coincide con lo reportado por Tenorio-Galindo *et al.* (2008) para las semillas de la especie *Cecropia obtusifolia* Bertol las cuales respondieron mejor a los tratamientos pregerminativos cuando mostraban una coloración café, apariencia lisa y un tamaño de 2 mm.

El tratamiento que incrementó el crecimiento en las plántulas de *Tillandsia macdougallii* significativamente fue el  $\text{KNO}_3$ , estas plantas presentaron mayor tamaño promedio (5.2 mm) que las del testigo (4.3 mm). En este sentido es importante destacar que el  $\text{KNO}_3$  en sus elementos libres es una fuente de nitrógeno y potasio que interviene en el desarrollo de las plantas. El nitrógeno forma parte de las proteínas y enzimas, además de ser necesario para la síntesis y la transferencia de energía. Forma parte de la clorofila que da la pigmentación y permite que crezcan las hojas. El Potasio ayuda a incrementar la fotosíntesis que provee moléculas carbonadas para la síntesis de energía, interviene en el crecimiento de las plantas debido a la activación de las enzimas, es necesario para la absorción del agua y la transpiración, este último aspecto lo efectúa controlando la apertura de los estomas de las hojas (Taiz & Zeiger, 2006). Siendo esencial este proceso para las especies epifitas de la familia Bromeliaceae.

Las semillas de *T. macdougallii* de la localidad “Las Juntas” mostraron un 86% de germinación en AG<sub>3</sub> siendo el valor más alto. Una posible explicación del efecto de los tratamientos pregerminativos, es la condición de las semillas durante la cosecha. Existen factores que influyen en la calidad física y fisiológica, como las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa etc.), el sitio de establecimiento, la presencia de depredadores, patógenos y la falta de polinizadores durante el proceso de maduración de las cápsulas y liberación de las semillas. Por ejemplo, en la especie *Salicornia bigelovii* en la que se evaluó la germinación en seis diferentes ecotipos y en la cual se encontró que el sitio de establecimiento influye en la condición fisiológica de las semillas, los valores de germinación obtenidos en el tratamiento con nitrato de potasio, oscilaron entre 26 y 85 % siendo este último el mayor de acuerdo al ecotipo (Wong-Corral *et al.*, 2005).

#### 4.7 Conclusiones

El tratamiento pregerminativo que mejoro el porcentaje de germinación en un 14 % con respecto al testigo fue el ácido giberelico (AG<sub>3</sub>) aplicado a la especie *T. macdougallii* (localidad “Las Juntas”). Es importante destacar que las semillas que presentaron baja calidad fisiológica (60 %) pueden recuperar su poder germinativo con el uso de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) como fue el caso de esta especie. Por otro lado el compuesto nitrato de potasio (KNO<sub>3</sub>) tuvo un efecto importante en el crecimiento de las hojas de la especie *Tillandsia macdougallii*.

#### 4.8 Literatura citada

- Bonin, M. P., C. Pedroso-de-Moraes, G. A. Martini, P. Verdolin-Benedito & T. Souza-Leal. 2010. Avaliação dos tratamentos pré-germinativos em diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> na germinação de *Alcantarea imperialis* (Vell.) Harms. *Scientia Plena*. 6(5):1-4.
- Bradford, K. J. 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress condition. *Horticultural Science*. 21(5): 1105-1110.
- Camacho, M. F. 2011. Dormición de semillas: causas y tratamientos. 2da edición. Ed. Trillas. México, D. F. 232p.
- Coelho, M. F. B., S. N. Vieira, L. A. Chig, L. W. Santos & M. C. F. Albuquerque. 2011. Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae). *Horticultura Brasileira*. 29: 472-476.
- Evert, R. E. 1992. Biología de las plantas. 4ta edición. Ed. Reverté, S. A. Barcelona, España. pp 488-492.
- Hernández. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*. 27(1):15-23.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1996. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 24, Supplement. 243 p.
- Magnitskiy, S. V. & G. A. Ligarreto. 2007. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y del ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 1(2):137-141.
- Pereira, A. R. 2009. Comportamiento germinativo de especies epífitas e rupícolas de Bromeliaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 32(4) pp. 827-838.
- Pinheiro, F. & F. Borghetti. 2003. Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) Griesbach and *Streptocalyx floribundus* (Martius ex Shultes f.) Mez (Bromeliaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 17(1): 27-35.
- Popinigis, F. 1985. Fisiología da semente. 2da. edición. Ed. Silia-DF. Brasil. 289 p.
- Ramos, M. & P. Zavaleta. 1993. Síntesis botánica. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. D.F. México. pp. 53-60.

- Sarihan, E. O., A. Ipek, K. Mahmood, M. Atak & B. Gurbuz. 2005. Role of GA<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub> in improving the frequency of seed germination in *Plantago lanceolata* L. Pakistan. *Journal of Botany*. 37(4):883-887.
- Sathish, S., S. Sundareswaran & N. Ganesan. 2011. Influence of seed priming on physiological performance of fresh and aged seeds of maize hybrid [coh(m) 5] and it's parental lines. ARPN. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 6(3):12-17.
- Shepley, S. C. & J. L. Chang. 1972. Does Gibberellic Acid Stimulate Seed Germination via Amylase Synthesis. *Plant Physiology*. 49:441-442.
- Suni, M., A. Cano & G. Vadillo. 2001 Ensayos preliminares en *Puya raimondii* Harms (BROMELIACEAE) *Revista Peruana de Biología*. (8)1: 53-59
- Taiz, L. & E. Zeiger. 2006. Plant physiology. 3ra edición. Ed. Universitat Jaume I. D. L. pp. 328-498.
- Tenorio-Galindo, G., A. Dante, Rodriguez-Trejo & G. López-Ríos. 2008. Efecto del tamaño y color de la semilla en la germinación de *Cecropia obtusifolia* bertol (Cecropiaceae). *Agrociencias*. 42:585-593.
- Vadillo, G., M. Suni & A. Cano. 2004. Viabilidad y germinación de *Puya Raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana de Biología*. 11(1):71-78.
- Wong-Corral, F. J., J. Borboa-Flores, M. Ortega-Nieblas, J. León-Lara, F. J. Cinco-Moroyoqui & E. O. Rueda-Puente. 2005. Mejoramiento de la germinación de seis ecotipos de salicornia (*Salicornia bigelovii*) con nitrato de sodio. *Biotechnia*. VII(2): 28-33.

## CAPITULO V. GERMINACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE *Tillandsia macdougallii* L. B. Sm. (Bromeliaceae) EN DIFERENTES SUSTRATOS

### 5.1 Resumen

Uno de los problemas a los que se enfrenta el cultivo de bromelias, es la determinación del medio de soporte o sustrato, debido a que las plantas requieren características físicas que asemejen las condiciones en las que se encuentran de manera natural. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la germinación y establecimiento de plántulas de la especie *Tillandsia macdougallii* en diferentes sustratos. Se realizaron cuatro experimentos, en el número 1, se tomaron plántulas de 45 días de edad, se formaron 4 repeticiones de 25 individuos y se establecieron en los siguientes 4 sustratos: 1) Hojas de *Tillandsia* secas, 2) Hojas de *Tillandsia* secas, pet moss y carbón 1:1:1, 3) Hojas de pino y 4) Hojas de pino, pet moss y carbón 1:1:1. En el experimento 2, se formaron 4 repeticiones con 20, 14 y 16 plántulas y se utilizaron 4 sustratos simples 1) Carbón, 2) Vermiculita, 3) Pet moss y 4) Piedra pómez. En el experimento 3, se formaron 5 repeticiones de 20 semillas las cuales se sembraron en 3 sustratos: Fibra de coco-vermiculita 3:1 (FC-V), perlita-vermiculita 1:1 (P-V) y aserrín, en dos ambientes: cámara de ambiente controlado (Ambiente 1) e Invernadero (Ambiente 2). Se evaluó durante 336 días. En el experimento 4, se formaron 5 repeticiones de 20 semillas y se colocaron en el sustrato FC-V 3:1 con malla. Las evaluaciones fueron por 227 días. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias de Tukey. En el experimento 1 las plántulas no sobrevivieron, se contaminaron a unas cuantas horas. En el experimento 2, los vástagos que presentaron mayor tiempo de sobrevivencia, fue en el sustrato de vermiculita (75 días). En el experimento 3, el mayor porcentaje de germinación lo obtuvo el sustrato de aserrín (85 %  $\pm$  17.0) del

ambiente 1 y el menor porcentaje fue para FC-V (53 %  $\pm$  10.6) del ambiente 2. En cuanto al mejor porcentaje de sobrevivencia lo presentó el sustrato FC-V (47 %) del ambiente 1. En el experimento 4, el porcentaje más alto de germinación fue 72 % y de sobrevivencia de 42 % en el ambiente 1. Con esta investigación se logró establecer que la mezcla fibra de coco y vermiculita, es un buen sustrato para el desarrollo de *Tillandsia macdougallii*.

**Palabras clave:** *T. macdougallii*, sustratos, germinación, sobrevivencia

## 5.2 Abstract

One of the problems the growing of bromeliad faces is determining the support means or substrate, because plants require physical characteristics similar to those of plants growing wild. For this reason, the objective of this study is to evaluate the germination and establishment of seedlings of *Tillandsia macdougallii* species in different substrates. 4 experiments were performed; in number 1, 45-day-old seedlings were taken, 4 repetitions of 25 individuals were formed and 4 substrates were established as follows: 1) *Tillandsia* dry leaves 2) *Tillandsia* dry leaves, pet moss and carbon 1:1:1 3) Pine leaves 4) Pine leaves, pet moss and carbon 1:1:1. In experiment 2, 4 repetitions with 20, 14 and seedlings were used and 4 simple substrates were used: 1) Carbon 2) Vermiculate 3) Pet moss 4) Pumice. In experiment 3, 5 repetitions of 20 seeds were formed and they were planted in 3 substrates: fiber of coco-vermiculate 3:1 (FC-V), perlite-vermiculate 1:1 (P-V), and sawdust, in two environments: environmental-controlled-chamber (environment 1) and greenhouse (environment 2). The evaluation

lasted 336 days. In experiment 4, 5 repetitions of 20 seeds were formed and they were put in FC-V 3:1 substrate with chain mail, the evaluations lasted 227 days. An analysis of variance and a comparison of the Tukey test were performed. The results in experiment 1 showed to be less efficient, the seedlings did not survive and got contaminated in a few hours. In experiment 2, the shoots that showed a great period of survival were those in the substrate of vermiculate (75 days). In experiment 3, the highest percentage of germination was gotten in the substrate of sawdust (85 %  $\pm$  17.0) in environment 1 and the lowest percentage was in FC-V (53 %  $\pm$  10.6) in environment 2. Regarding the best percentage of survival, it was shown in the substrate FC-V (47 %) in environment 1. In experiment 4, the highest percentage of germination was 72 % and that of survival was 42 % in environment 1. With this investigation, it was established that the mixture fiber of coconut and vermiculate is a good substrate for the development of *Tillandsia macdougallii*.

**Keywords:** *T. macdougallii*, substrates, germination, survival

### 5.3 Introducción

En la actualidad, un numeroso grupo de plantas epifitas que pertenecen a la familia Bromeliaceae han sido introducidas como plantas de ornato, debido a su diversidad morfológica y su extraordinaria belleza (Sandoval-Bucio, *et al.*, 2004).

La capacidad que tienen las bromelias de generar hijuelos, presentar un proceso de floración de forma alternada y por largos periodos (1 a 5 meses) y la facilidad de adaptarse a diferentes ambientes, las hacen atractivas para su cultivo y

comercialización (Sandoval-Bucio, *et al.*, 2004). No obstante en México el cultivo de bromelias es incipiente y la mayor parte de estas es recolectada de su medio natural, lo que las pone en peligro de extinción. Por esta razón su cultivo precisa de información técnica para que la producción y calidad de las plantas sean fomentada e incrementada de manera sustentable (Miranda *et al.*, 2007; Mondragón *et al.*, 2011).

Uno de los problemas a los que se enfrenta el cultivo de bromelias, es la determinación del mejor sustrato para la sobrevivencia de plántulas. Por esta razón, los sustratos para plantas epífitas deben cumplir con ciertas características como: baja densidad, un balance entre permeabilidad y retención de humedad además de una buena aireación, este debe secarse con rapidez en el área superficial y también es importante que no se descomponga rápidamente, pues esto disminuye las condiciones que favorecen el desarrollo de enfermedades. Todo esto con el objetivo de reunir las cualidades que permitan el éxito en la germinación y el establecimiento de plantas jóvenes y adultas (Stringheta *et al.*, 2005). Además, los sustratos deben estar disponibles, fáciles de transportar, abundantes y de bajo costo (Barbado, 2005).

Existen materiales que han sido probados y que cumplen la mayoría de estos requisitos y pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica, casi nunca se utilizan como sustrato un único material, generalmente consisten en mezclas de distintos materiales en diversas proporciones (Burés, 1997). Entre los materiales orgánicos que se utilizan para el cultivo se encuentran: la fibra de coco y el aserrín.

La fibra de coco es un subproducto del desfibrado de la nuez de coco (*Cocos nucifera*), procedente del mesocarpio, está compuesta de partículas de lignina y

celulosa, este material tiene elevada capacidad de retención de agua, además aumenta la disponibilidad de nutrientes.

El aserrín de pino es un material económico pero puede presentar algunos problemas de fitotoxicidad cuando se usa fresco. Sin embargo, el problema se puede corregir con el previo lavado cuando el aserrín ya fue degradado por procesos de descomposición que llevan a cabo distintos microorganismos que entran en acción y que efectúan la ruptura de enlaces por procesos mecánicos o de oxidación, hidrólisis entre otros. Los compuestos del aserrín al volver a su estado simple pierden sus propiedades tóxicas (Boodley, 1998; Burés, 1997).

Entre los materiales de origen inorgánico que se utilizan para horticultura se encuentran la perlita que proviene de roca volcánica vítrea formada por enfriamiento rápido; por otro lado la vermiculita es un material mineral cuya composición es la de un silicato hidratado de magnesio que tiene una gran capacidad de retener agua (Burés, 1997).

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar diferentes sustratos, simples o mezclas para el establecimiento de plántulas de *Tillandsia macdougallii* con el propósito de utilizarlo como una propuesta sustentable para la producción de plántulas a las comunidades del Estado de México.

#### **5.4 Materiales y métodos**

Los experimentos se llevaron a cabo en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillos, en las instalaciones de los laboratorios de Biofísica y Fisiología Vegetal Ambiental y Análisis de Semillas, cámaras de ambiente controlado e invernaderos de la institución.

Se realizaron cuatro experimentos con el uso de sustratos orgánicos e inorgánicos, dos con plántulas y dos con semillas.

## **Experimento 1**

### **Sobrevivencia**

El material vegetal utilizado fueron plántulas de 45 días de edad, se hizo una aleatorización y se formaron 4 repeticiones con 25 individuos (plántulas) cada una y se establecieron en los siguientes sustratos:

- 1) Hojas de *Tillandsia* secas (planta madre)
- 2) Hojas de *Tillandsia* secas, pet moss y carbón en proporción 1:1:1
- 3) Hojas de pino
- 4) Hojas de pino, pet moss y carbón en proporción 1:1:1

### **Preparación de sustratos**

#### **Hojas secas de *Tillandsia* (planta madre) y hojas de pino:**

1. Molienda. Se utilizó un molino con una malla de 1mm de diámetro, se molieron 500g de hojas secas por 15min.
2. Empaquetado. Se utilizaron bolsas de polietileno, para almacenar la molienda de hojas secas, se mantuvo en un lugar fresco y seco.

### **Carbón**

1. Molienda. Se realizó de forma manual mediante la trituración con un martillo, se separaron las partículas más pequeñas de aproximadamente 5mm y este tamaño se utilizó para elaborar las mezclas de cada uno de los sustratos.

2. Empaquetado. Se utilizaron bolsas de polietileno para almacenar el carbón triturado.

### **Pet moss**

1) Se utilizó pet moss (material orgánico de turba de sphagnum) parcialmente en descomposición, derivado de una acumulación de residuos de musgo acuático (marca premier). Cabe mencionar que este material se utilizó directamente del empaque para realizar las mezclas.

Posteriormente se procedió a realizar las siguientes mezclas: molienda de hojas secas de *Tillandsia*, pet moss y carbón triturado en proporción 1:1:1. Además de hojas de pino, pet moss y carbón en proporción 1:1:1. Se ensayaron dos sustratos sin mezclarse (hojas de *Tillandsia* seca y hojas de pino) posteriormente se esterilizaron en autoclave por 40 min.

Los sustratos se colocaron en cajas sandwicheras (lavadas con cloro al 20 % y perforadas previamente para evitar exceso de agua y la contaminación de las semillas) y se humedecieron a capacidad de campo, el exceso de agua se eliminó y posteriormente se realizó la siembra.

Al día siguiente se prepararon nuevos sustratos:

- 1) Hoja de pino
- 2) Hojas de pino, pet moss y carbón en proporción 1:1:1

Se realizó el trasplante, pero antes de ser colocadas las plántulas en estos nuevos sustratos se trataron con ridomil (malalaxil clorotalonii, 200mg en 500ml de agua),

primero se les realizó 3 lavados con agua destilada estéril y posteriormente se sumergieron en solución de ridomil por 40 minutos, agitando en lapsos de 10 min.

Estos sustratos se volvieron a infestar a los 2 días por lo que se volvió aplicar ridomil (malalaxil clorotalonii, 130 mg por 500 ml agua).

El diseño experimental que se realizó fue completamente al azar con 6 repeticiones.

## **Experimento 2**

### **Sobrevivencia**

Debido a la contaminación y al poco éxito de sobrevivencia de las plántulas del primer experimento (sustratos orgánicos) se ensayaron los siguientes materiales:

### **Carbón**

- 1) El carbón que se trituró previamente (partículas de aproximadamente 5mm) se utilizó como sustrato simple.

### **Pet moss**

- 1) Se utilizó pet moss, (turba de *sphagnum*) sin aplicarle ningún tratamiento.

### **Vermiculita**

- 1) Se empleó vermiculita de grado medio, directamente del empaque.

### **Piedra pómez**

1. Se realizó una selección de las partículas pequeñas de aproximadamente 3mm de diámetro.
2. Con agua destilada tres veces fue lavada la piedra pómez, para retirar el exceso de sales que contiene este material.

Cada uno de los materiales fue esterilizado por 20 minutos en autoclave.

Se realizó el experimento con semillas provenientes de tres plantas colectadas en Parada las Juntas Municipio de Temascaltepec. Una vez germinadas las semillas, las plántulas se aleatorizaron y se formaron 4 repeticiones (Cuadro 11), estas fueron sumergidas previamente en fungicida ridomil (130 mg x 500 ml agua) durante 40 minutos y se les realizó 3 enjuagues con agua destilada esterilizada.

La caja sandwichera utilizada para recibir el sustrato se desinfectó con cloro (50 ml en 950 ml agua), se humedeció el sustrato a capacidad de campo, posteriormente las plántulas se pasaron a los sustratos y se asperjaron con 5 ml de rodimil (130 mg x 500 ml agua) (Figura 9) Las plantas permanecieron en una cámara de ambiente controlado con fotoperiodo 12/12 a una temperatura de 25°C.

**Cuadro 11.** Número de plántulas de semillas de tres plantas madre, sobre cuatro sustratos.

Sustrato				
PLANTA	VERMICULITA	P. PÓMEZ	CARBÓN	PET MOSS
1	20	20	20	20
2	14	14	13	14
3	16	16	16	15

En este experimento los sustratos no se contaminaron, sin embargo; las plántulas sí por hongos y comenzaron a morir. Se evaluó la sobrevivencia de plántulas.

### Fertilización

1. 10 días después del trasplante se preparó una infusión de hojas secas de *Tillandsia macdougallii* (planta madre).

2. Las hojas de la planta madre se dejaron secar y posteriormente se molieron en un molino con diámetro de la malla 1mm.
3. Se hirvió 500 ml de agua destilada a la que posteriormente se le agrego 1g de hojas de planta madre, se apagó la flama del mechero y se cubrió el vaso de precipitado con papel aluminio por 10 minutos.
4. Las plántulas se regaron a partir de los 15 días después del trasplante y se aplicó cada tercer día el riego con la infusión.

El total de plántulas se subdividió, para hacerles la aplicación de la infusión de planta madre (Cuadro 12)

**Cuadro 12.** Número de plántulas en los sustratos: vermiculita, piedra pómez, carbón y pet moss, regadas con: IPM= Infusión planta madre, AD= agua destilada.

Sustrato								
PLANTA	VERMICULITA		P. PÓMEZ		CARBÓN		PET MOSS	
	IPM	AD	IPM	AD	IPM	AD	IPM	AD
1	10	10	10	10	10	10	10	10
2	7	7	7	7	6	7	7	7
3	8	8	8	8	8	8	7	8



**Figura 8.** Sustratos con plántulas de *T. macdougllii*, de izquierda a derecha; carbón, pómez, vermiculita y pet moss.

Se evaluó la sobrevivencia con un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones.

### **Experimento 3**

#### **Germinación y Sobrevivencia**

Para este experimento se utilizaron semillas de la especie *T. macdougllii* de la Localidad “Las Juntas”, se ensayaron 4 sustratos bajo dos ambientes: cámara de ambiente controlado a 20 °C (Ambiente 1) e Invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24 °C (Ambiente 2) (Figura 10 y 11).



**Figura 9.** Cámara de ambiente controlado a temperatura de 20 °C (ambiente 1)



**Figura 10.** Invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24 °C (ambiente 2)

Los sustratos que se usaron para la germinación y establecimiento de las semillas fueron los siguientes:

- 1) Fibra de coco con vermiculita 3:1
- 2) Perlita con vermiculita 1:1
- 3) Aserrín (*Pinus ayacahuite*)

Antes de realizar las mezclas y caracterizar los sustratos se realizó lo siguiente:

### **Pretratamiento del aserrín**

El aserrín de *Pinus ayacahuite* proviene de un bosque con manejo sustentable y pertenece a la localidad de San Pedro Tultepec, Estado de México.

- 1) Se realizaron tres lavados con agua corriente en el aserrín fresco, posteriormente se puso a hervir por 2 h, se enfrió por una noche y se dejó a la intemperie por 20 días.
- 2) Posteriormente se secó por 2 días a 60 °C en una estufa para secarlo completamente.
- 3) Se esterilizo en autoclave por 40 min.

Este proceso se realizó debido a que se pretendía disminuir el grado tóxico de la madera que contiene lignina y resinas.

### **Fibra de coco**

1. Esta fue lavada con agua corriente, cuatro veces, posteriormente se realizó un enjuague con agua destilada se dejó secar a temperatura ambiente en el laboratorio.
2. Se esterilizo por 40 minutos en autoclave.

### **Caracterización física de sustratos**

Se evaluaron las propiedades físicas (densidad aparente ( $D_a$ ), porosidad total ( $P_t$  %), porosidad de aireación ( $P_{ai}$  %), porosidad de retención de humedad ( $R_h$  %) de tres sustratos, determinados por el método de Ansorena (1994); y la curva de retención de humedad, por el método De Boodt (1964). Los sustratos fueron elaborados a partir de la mezcla de los siguientes materiales: Fibra de coco- Vermiculita (FC-V), (3:1), Perlita-Vermiculita (P-V) (1:1), El tamaño de la partícula de la perlita y la fibra de coco fue de 1mm de diámetro y la vermiculita comercial de grado uno. Para obtener los diámetros de las partículas se utilizó una criba de la dimensión ya mencionada.

### **Densidad aparente ( $D_a$ )**

Para determinar la Densidad aparente se utilizaron permeámetros (tubos de PVC) con perforaciones en la parte inferior. En primer lugar se determinó el volumen de los permeámetros, para ello, se pesó el recipiente con cinta adhesiva que cubría las perforaciones, posteriormente se llenó con agua y se pesó, al peso obtenido se le resto el peso del parámetro sin agua y el valor obtenido se tomó como el volumen del permeámetro. La masa se obtuvo saturando los sustratos con agua en recipientes de

aproximadamente 1000 ml, una vez saturadas las muestras se colocaron en los permeámetros hasta llenarlos y se dejó drenar el agua retirando la cinta adhesiva de las perforaciones. Una vez drenadas, las muestras se pusieron en charolas de aluminio previamente pesadas dentro de una estufa a una temperatura constante de 70 °C por aproximadamente 24 h para determinar el peso seco. El peso se obtuvo restando el peso de la charola y la diferencia se tomó como la masa del sustrato.

La Densidad aparente se determinó aplicando la fórmula masa sobre volumen.

$$DA = \text{peso seco de la muestra} / \text{volumen del permeámetro}$$

### **Porosidad total (Pt), Porosidad de aireación (Pai) y Retención de humedad (Rh)**

Para determinar la porosidad se tomaron los datos de la prueba de densidad aparente, en este caso se tomó el peso de los sustratos saturados y drenados. Con las diferencias de estos datos se obtuvo el volumen de aire y con la resta del peso saturado menos el peso del sustrato seco se obtuvo el volumen de poros.

Para obtener los porcentajes de Porosidad total (Pt), Porosidad de aireación (Pai) y Retención de humedad (Rh) se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Porosidad total (\%)} = \% Pt = (\text{volumen total de poros} / V_p) * 100$$

$$\text{Porosidad de aireación (\%)} = \% Pai = (V_{ai} / V_p) * 100$$

$$\text{Retención de humedad (\%)} = \% Rh = \% Pt - \% Pai$$

### **Curva de retención de agua**

El método propuesto por De Boodt (1974) y Ansorena (1994), se basa en establecer tensiones de 0 a 100 cm a los sustratos contenidos en embudos. En las curvas de retención de humedad se consideraron los siguientes parámetros:

## Desinfestación de semillas

- 1) Las semillas se colocaron en fungicida Ridomil (1 %) por 20 min
- 2) Se les realizó tres enjuagues con agua esterilizada y se sumergieron en cloro al 20 % por 15min, finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

Los sustratos se colocaron en cajas sandwicheras (lavadas previamente con cloro al 20 %), se humedecieron a capacidad de campo (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Mezclas de sustratos humedecidos con la proporción de agua a capacidad de campo.

Sustratos	Agua destilada estéril aplicada (ml)
Fibra de coco-vermiculita	50
Perlita-vermiculita	150
Aserrín	70

Las semillas ya desinfectadas se sembraron en la superficie de los sustratos, posteriormente se cubrió la caja con una película adherible para evitar contaminación y mantener la humedad en las cajas. Durante 8 días, las semillas permanecieron en un cuarto de germinación, a luz constante y una temperatura de  $30 \pm 1$  °C, en espera de su germinación (la indicación fue la coloración verde de la semilla y el hipocótilo expuesto) (Figura 11).

Las semillas germinadas después de 8 días se trasladaron a los respectivos ambientes. El diseño estadístico fue completamente al azar con 5 repeticiones, las variables analizadas fueron: sobrevivencia, tamaño y número de hojas por plántula (Cuadro 14).

Se fertilizo a los 35 días después de la siembra, el producto aplicado fue PHC HealthyStart 12-6-12 (fertilizante foliar orgánico) se aplicó diluido con agua destilada al 1 %.

El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones, las variables analizadas fueron: sobrevivencia, tamaño y número de hojas por plántula.

**Cuadro 14.** Distribución de las 100 semillas para cada uno de los sustratos; FC-V=fibra de coco –vermiculita (3:1); P-V=Perlita-Vermiculita (1:1); A=aserrín; R1-R5= repeticiones; °T=temperatura.

<b>Ambientes</b>	<b>Sustratos</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
Ambiente 1 Cámara (20°C)	FC-V	20	20	20	20	20
	P-V	20	20	20	20	20
	A	20	20	20	20	20
Ambiente 2 Invernadero (°T media 20.31°C)	FC-V	20	20	20	20	20
	P-V	20	20	20	20	20
	A	20	20	20	20	20



**Figura 11.** Plántulas sobre los sustratos: fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1), aserrín (*Pinus ayacahuite*), en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C).

#### **Experimento 4**

##### **Sustrato con malla**

- 1) Se utilizaron semillas de *T. macdougallii* de la localidad “Las Juntas”. El sustrato fue fibra de coco con vermiculita 3:1 (previamente esterilizado por 40 minutos en autoclave) sobre el sustrato se colocó una malla de plástico para invernadero con orificios de 1mm de diámetro.
- 2) Las cajas sandwicheras y la malla se lavaron con cloro al 20 %.
- 3) Las semillas se colocaron en fungicida Ridomil (1 %) por 20 min posteriormente se les realizó tres enjuagues con agua esterilizada y se sumergieron en cloro al

20 % por 15min, finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

- 4) Los sustratos se colocaron en cajas sandwicheras (lavadas previamente con cloro al 20 %), se humedecieron a capacidad de campo, posteriormente se colocó la malla y sobre esta las semillas previamente desinfectadas se colocaron en dos ambientes (cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24 °C).

El diseño estadístico fue completamente al azar con cinco repeticiones, las variables analizadas fueron: sobrevivencia, tamaño y número de hojas por plántula (Cuadro15)

**Cuadro 15.** Distribución de 100 semillas de la especie *T. macdougallii* sobre el sustrato; fibra de coco-vermiculita (3:1) con malla.

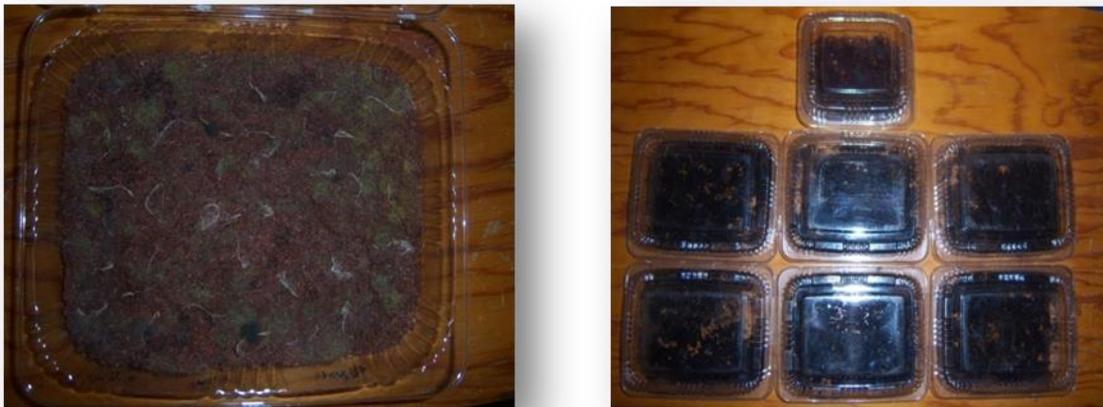
Sustratos	Ambientes	R1	R2	R3	R4	R5
Fibra de coco- vermiculita y malla	Cámara de	20	20	20	20	20
	Ambiente controlado					
	Invernadero	20	20	20	20	20

## 5.5 Resultados

### Experimento 1

Los sustratos orgánicos (planta madre, hojas de pino, petmoss y carbón) que se ensayaron en este experimento mostraron ser inadecuados para el cultivo de *Tillandsia macdougallii* debido a que no sobrevivieron las plántulas.

Los sustratos se contaminaron al día siguiente del trasplante a pesar de que habían sido tratados químicamente por lo que se infiere que estos sustratos al ser ricos en nutrientes, además de alta retención de humedad del sustrato y un ambiente cálido, propiciaron un medio excelente para la proliferación de patógenos (hongos y bacterias). Por esta razón no se logró evaluar la respuesta de sobrevivencia sobre estos sustratos (Figura 12).



**Figura 12.** Plántulas de *T. macdougallii* en sustratos orgánicos, izquierda: mezcla de hojas de planta madre, petmoss y pino, sustrato totalmente contaminado derecha: mezcla de pino, pet moss y carbón sin sobrevivencia.

Las plántulas sobrevivientes del experimento 1 (sustratos orgánicos), antes de colocarse en los nuevos sustratos se trataron con fungicida para evitar que se contaminaran nuevamente (Cuadro 16 y 17).

**Cuadro 16.** Número de plántulas sobre los sustratos: S1=Hojas de pino y S2=Hojas de pino, pet moss y carbón (1:1).

PLANTA	S1	S2
1	20	20
2	14	14
3	16	16
4	20	20
5	13	14
6	16	15

**Cuadro17.** Análisis de varianza de 2 sustratos a los 7 días de sobrevivencia y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato; LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

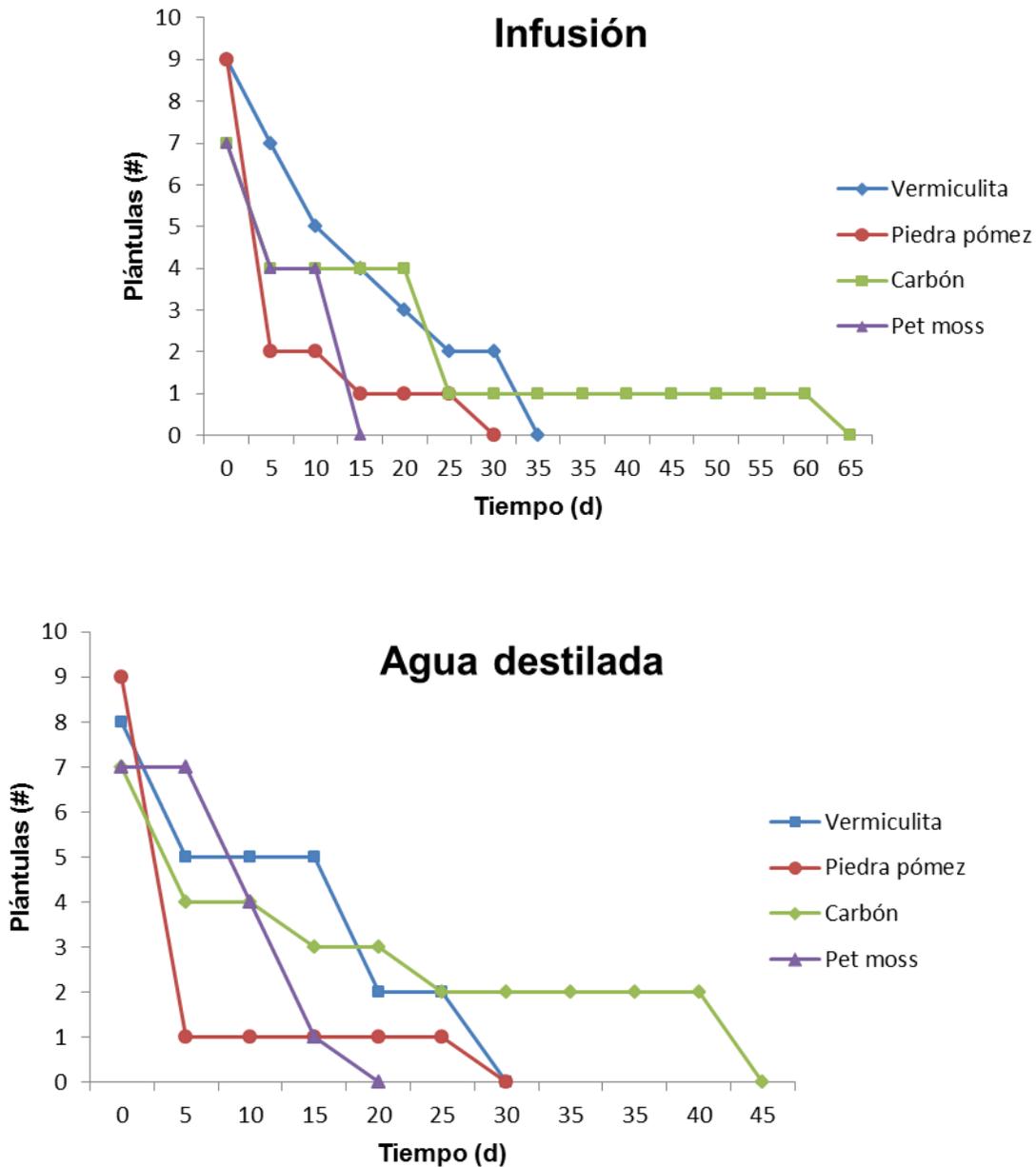
	FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	1		0.3333	0.3333	0.8449	NS
Error		10	82.6667	8.2667		
Total		11	83.0000			

Sustrato	Media
S1	16.667a
S2	16.333a

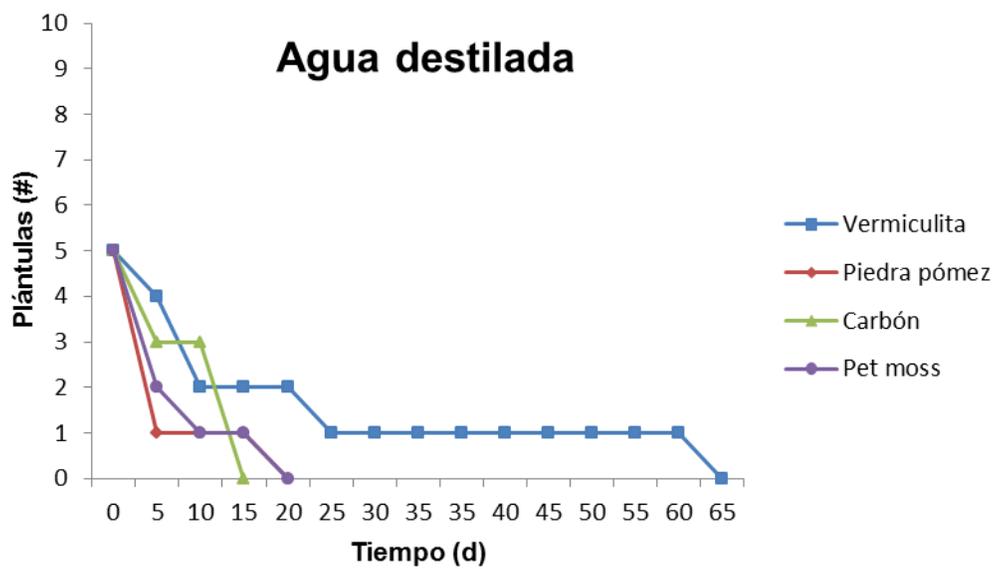
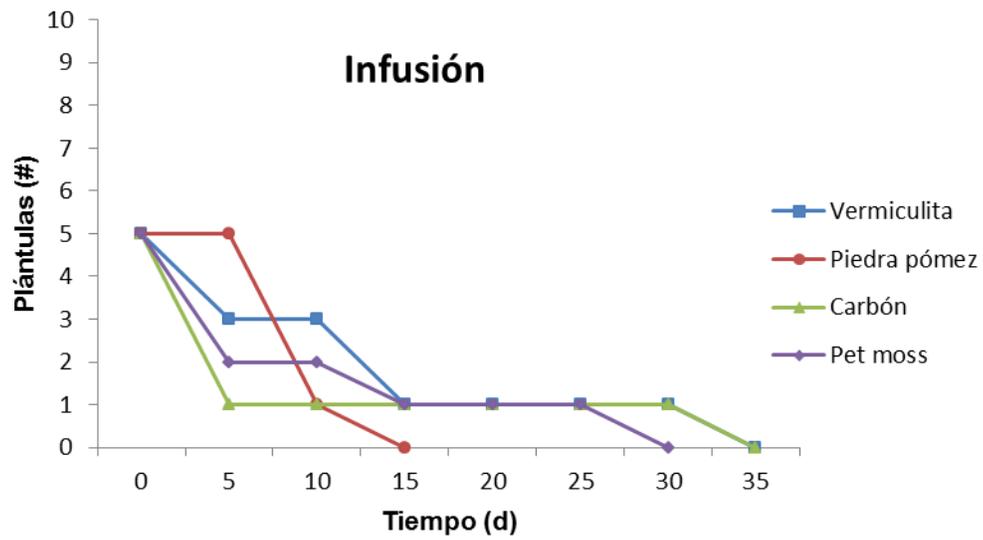
Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales. S1=Hojas de pino y S2=Hojas de pino, pet moss y carbón (1:1)

## Experimento 2

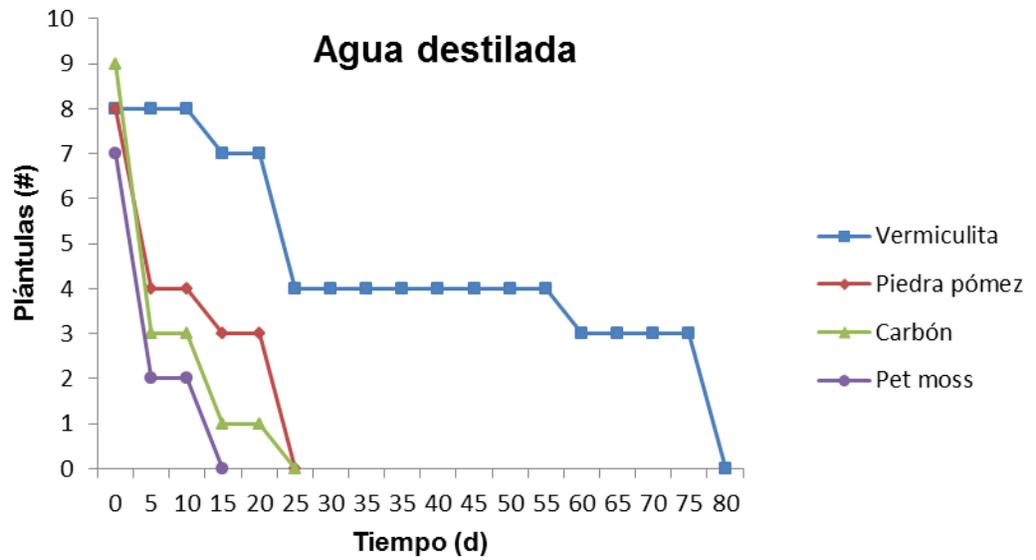
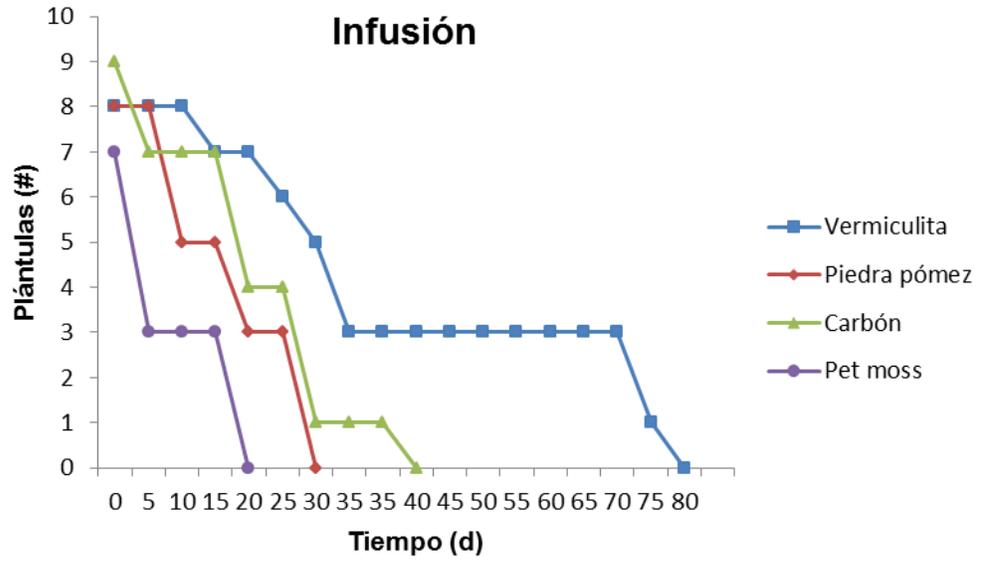
En las siguientes gráficas se muestra como fue el proceso de sobrevivencia en cada sustrato (vermiculita, piedra pómez, carbón y pet moss) y tipo de riego (Figuras 13, 14 y 15).



**Figura 13.** Sobrevivencia de plántulas especie *Tillandsia macdougallii* (planta 1) en sustratos con dos tipos de riego: infusión y agua destilada, n=9,8 y7.



**Figura 14.** Sobrevivencia de plántulas, especie *Tillandsia macdougallii* (planta 2) en sustratos con dos tipos de riego: infusión y agua destilada, n=5.



**Figura 15.** Sobrevivencia de *Tillandsia macdougallii* (planta 3) en sustratos con dos tipos de riego: infusión y agua destilada, n=9,8 y 7.

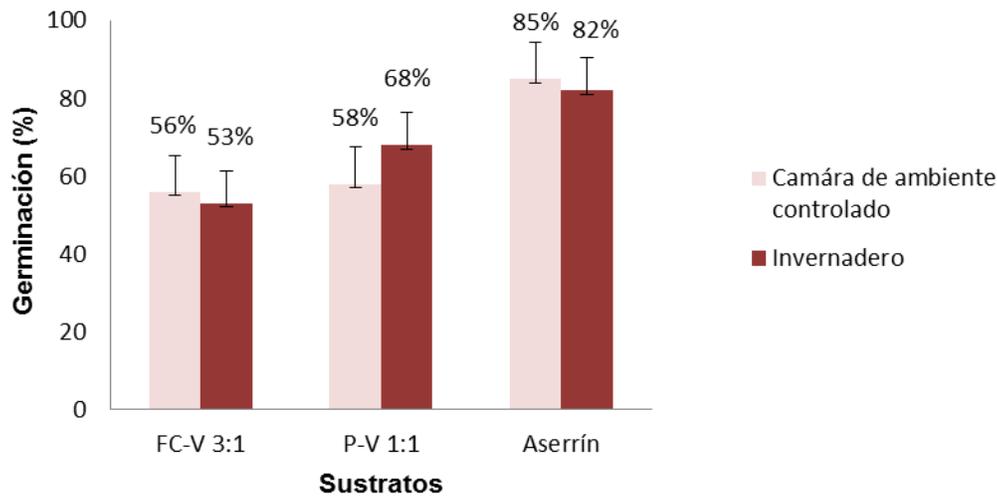
El sustrato que presento mayor tiempo de sobrevivencia, fue la vermiculita (75 días) de la planta 3 con 3 individuos, al parecer la alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) que presenta la vermiculita, permitió la adsorción de nutrientes que se encontraban en la infusión que se aplicó a las plántulas y que de manera indirecta tuvo contacto con el sustrato para que después fueran liberados paulatinamente y ser aprovechados por las plántulas; por el contrario el sustrato con baja sobrevivencia fue el pet moss (12 días), las partículas de este sustrato eran muy pequeñas que se compactaban, evitando así la filtración y favoreciendo la proliferación de hongos, además es importante destacar que el uso de este sustrato dificultó la observación, porque el color de las plántulas no contrastaban con el sustrato.

Se ensayó una solución nutritiva a base de una infusión de hojas secas de *Tillandsia macdougallii* y se comparó con agua destilada, la respuesta no fue favorable porque no se obtuvo una diferencia notable y finalmente las plántulas fenecieron. Sin embargo, en algunos sustratos se extendió por unos días más la sobrevivencia, en el carbón las plántulas que se regaron con la infusión se prolongó 35, 40 y 65 días, a diferencia del riego con agua destilada 15, 25 y 45 días. En el sustrato de piedra pómez la sobrevivencia fue de 25 días, la baja retención de humedad generó una frecuencia diaria de riego, además la alcalinidad (pH 7.63) del sustrato provocó que el exceso de solutos presentes en este material, causara la pérdida de agua en las células vegetales, ocasionando que finalmente las plántulas no sobrevivieran.

### Experimento 3

Se estudiaron dos mezclas de materiales orgánicos e inorgánicos y un sustrato puro: fibras de coco con vermiculita 3:1, perlita-vermiculita 1:1, y aserrín. El inicio de la germinación de *Tillandsia macdougallii* ocurrió a los 6 días y el porcentaje total de semillas germinadas se registró a los 10 días en los diferentes sustratos. El estudio se llevó a cabo en dos ambientes: 1) Cámara de ambiente controlado (20 °C) y 2) Invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24 °C).

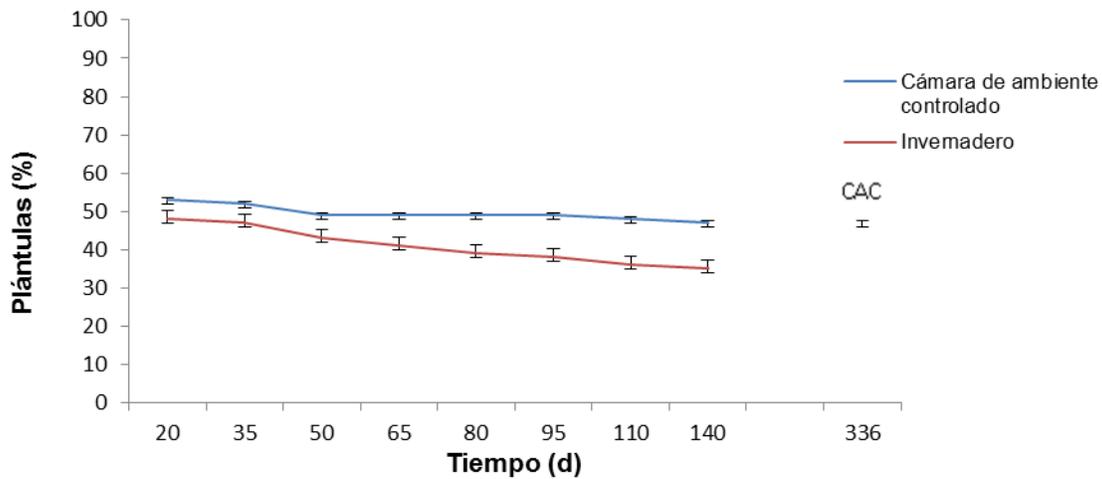
Los valores de germinación media obtenidos a los 10 días en los tres sustratos fueron los siguientes: para fibra de coco-vermiculita (3:1) (cámara 56 % ± 11.2 y en el Invernadero 53 % ± 10.6). Para perlita-vermiculita (1:1) (cámara 58 % ± 11.6 y para el invernadero 68 % ± 13.6). En aserrín (cámara 85 % ± 17.0 y en el invernadero 82 % ± 16.4). El sustrato que mostro mayor porcentaje de germinación fue el aserrín, sin embargo, el sustrato con un menor porcentaje fue la fibra de coco-vermiculita (3:1) en los dos ambientes (Figura 16).



**Figura 16.** Porcentaje de germinación a los 10 días después de la siembra, los sustratos evaluados fueron: FC-V=fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V=perlita-vermiculita (1:1) y aserrín (*Pinus ayacahuite*), n=100, ‡=barras de error estándar.

En las Figuras 17, 18 y 19 se muestra el comportamiento de sobrevivencia en el tiempo (140 y 336 días en cámara de ambiente controlado e invernadero respectivamente), existiendo diferencias significativas entre sustratos y ambientes.

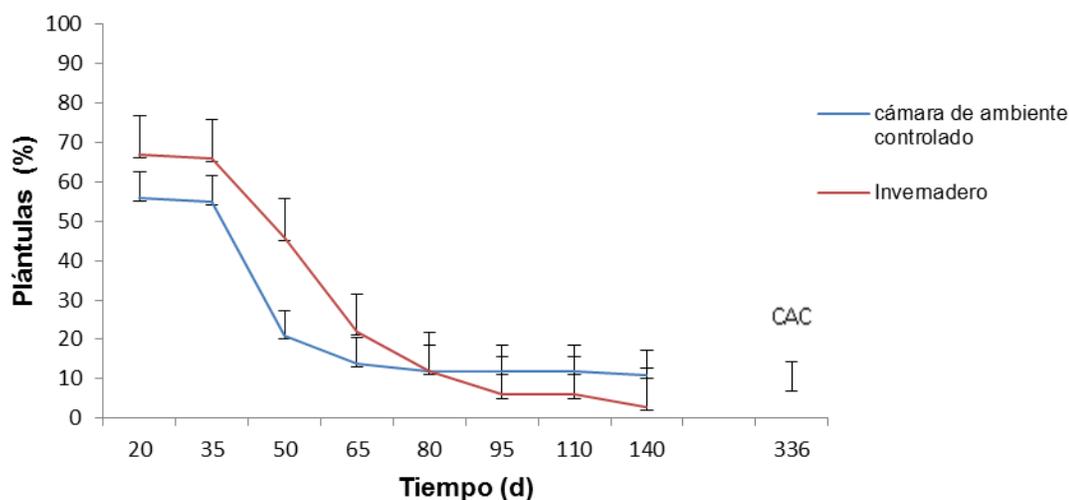
Las plántulas que crecieron sobre el sustrato (fibra de coco-vermiculita, 3:1), mostraron un comportamiento muy constante en los dos ambientes a lo largo de 140 días, a los 10 días después de la siembra inicio la contaminación por hongos y se aplicó fungicida a las plántulas (ridomil, malalaxil clorotalonii al 1 %) en dos ocasiones (10 y 15 días). A los 336 días las plántulas creciendo en la cámara de ambiente controlado mantuvieron un porcentaje de sobrevivencia constante (Figura 17).



**Figura 17.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre fibra de coco-vermiculita (3:1), en el ambiente 1, CAC (cámara de ambiente controlado a 20 °C) la sobrevivencia se prolongó por 336 días y en el ambiente 2, (invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) la sobrevivencia fue de 140 días, n=100, ±= barras de error estándar

En la Figura 18 se aprecia el porcentaje de sobrevivencia (perlita-vermiculita 1:1), después de 35 días las plántulas mostraron un deceso muy rápido en los dos ambientes.

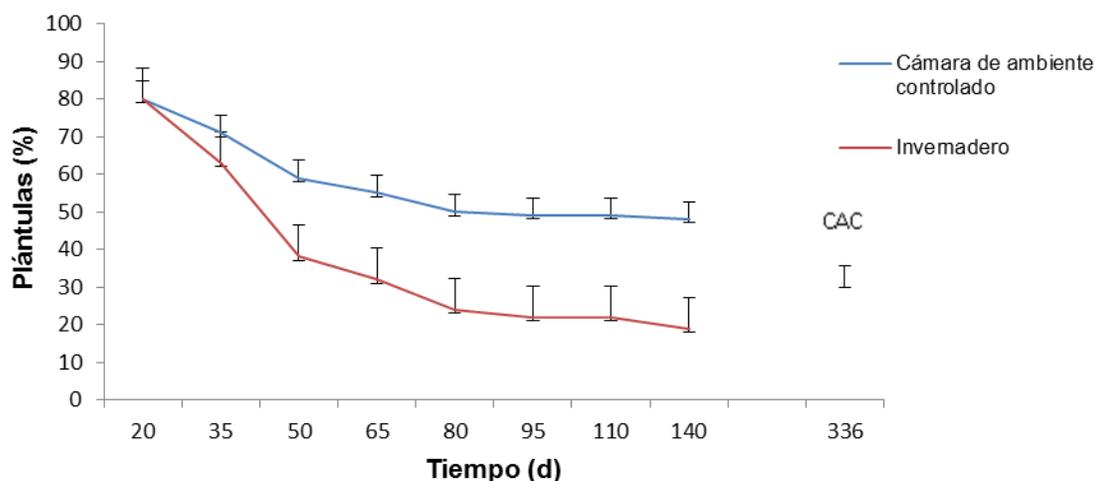
En el sustrato perlita-vermiculita (1:1) se presentó el crecimiento de algas que invadiendo posteriormente un 80 % de las plántulas, esto posiblemente ocasiono una fuerte competencia entre el luz y nutrientes que provocó la muerte de las plántulas. Este evento comenzó después de que las plántulas se fertilizaron aproximadamente a los 8 días.



**Figura 18.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre el sustrato perlita-vermiculita (1:1), solo en el ambiente 1, CAC (cámara de ambiente controlado a 20 °C) la sobrevivencia se prolongó por 336 días y en el ambiente 2, (invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) la sobrevivencia fue de 140 días, n=100, ±= barras de error estándar

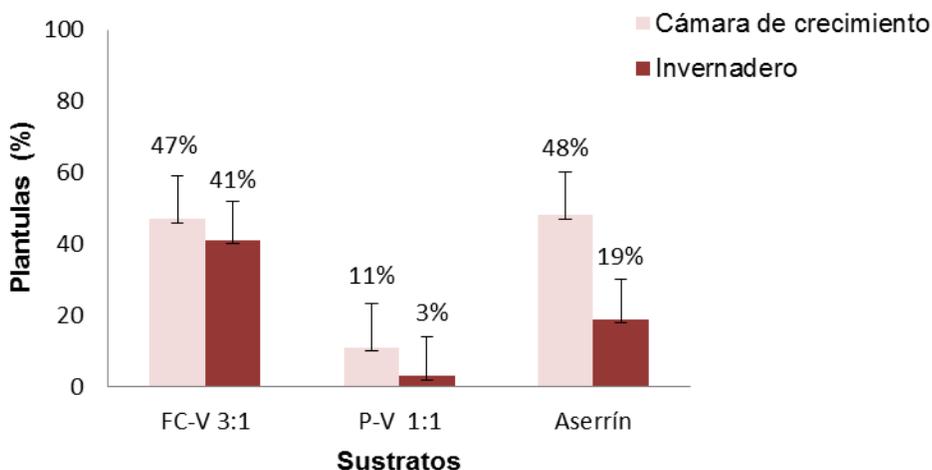
La Figura 19 muestra el porcentaje de sobrevivencia de plántulas creciendo en aserrín la cual decreció a los 35 días en ambos ambientes. Las plántulas comenzaron a presentar una coloración oscura y finalmente se tornaron de color negro, siendo las del invernadero las que presentaron este proceso de forma más rápida, finalmente fenecieron. Las plántulas que crecieron en la cámara mostraron un color verde más intenso a diferencia de las que se encontraban en el invernadero.

Las plántulas que crecieron sobre aserrín en el ambiente 1 a los 336 días obtuvieron una sobrevivencia de 31 %, además el crecimiento disminuyó (altura de la plántula) y la formación de hojas fue baja.



**Figura 19.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre aserrín de *Pinus ayacahuite*, en el ambiente 1, CAC (cámara de ambiente controlado 20 °C) la sobrevivencia se prolongó por 336 días, n=100, ‡=barras de error estándar.

En la Figura 20 se muestra el porcentaje total de plántulas que sobrevivieron a los 140 días en los sustratos fibra de coco-vermiculita 3:1, perlita-vermiculita 1:1 y aserrín en cámara de crecimiento e invernadero.



**Figura 20.** Porcentaje de sobrevivencia a los 140 días en los sustratos: FC-V=fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V=perlita-vermiculita (1:1) y aserrín (*Pinus ayacahuite*), n=100, ‡=barras de error estándar.

El deceso de las plántulas en el sustrato perlita-vermiculita (1:1) fue drástico en los dos ambientes, por otro lado en el aserrín y fibra de coco-vermiculita (3-1) del ambiente 1 son los que presentaron un mayor porcentaje de sobrevivencia, en el aserrín el crecimiento se vio afectado, las plántulas no desarrollaron numerosas hojas de 4 a 16 por plántula y fueron pequeñas en promedio 5.84 mm a diferencia del sustrato con fibra de coco-vermiculita (3:1) que son plántulas más grandes de 20.12 mm y formaron entre 8 a 20 hojas.

En cuanto al porcentaje de sobrevivencia se obtuvieron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los sustratos y los ambientes evaluados a los 20, 80, 140 y 336 días (Cuadros 18-21), con las pruebas de Tukey se determinó el porcentaje de sobrevivencia medio mayor por sustrato (Cuadro 22)

**Cuadro 18.** Análisis de varianza para los parámetros evaluados por ambientes y sustratos a los 20 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

**Cámara de ambiente controlado**

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	103.60000	51.8000	0.0064	*
Error	12	78.0000	6.5333		
Total	14	182.0000			

Sustrato	Media
Aserrín	16.000a
P-V	11.200b
FC-V	10.600b

**Invernadero**

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	87.6000	43.8000	0.0031	*
Error	12	54.0000	4.5000		
Total	14	141.60000			

Sustrato	Media
Aserrín	16.000a
P-V	13.400b
FC-V	9.600b

**Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales. CAC: cámara de ambiente controlado, P-V: perlita-vermiculita (1:1), FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1).**

**Cuadro 19.** Análisis de varianza para los parámetros evaluados por ambientes y sustratos a los 80 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.  
**Cámara de ambiente controlado**

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	187.6000	93.8000	0.0004	*
Error	12	70.0000	5.8333		
Total	14	5.8333			

Sustrato	Media
Aserrín	10.000a
FC-V	9.800 a
P-V	2.400 b

**Invernadero**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P</b>	<b>SIG</b>
Sustrato	2	73.2000	36.6000	0.001	*
Error	12	38.8000	3.2333		
Total	14	112.0000			

<b>Sustrato</b>	<b>Media</b>
FC-V	7.800 a
Aserrín	4.800 b
P-V	2.400 b

**Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales. CAC: cámara de ambiente controlado, P-V: perlita-vermiculita (1:1), FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1).**

**Cuadro 20.** Análisis de varianza para los parámetros evaluados por ambientes y sustratos a los 140 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

**Cámara de ambiente controlado**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P</b>	<b>SIG</b>
Sustrato	2	177.7300	88.8667	0.0002	*
Error	12	59.2000	4.9333		
Total	14	236.9333			

<b>Sustrato</b>	<b>Media</b>
Aserrín	9.600 a
FC-V	9.400 a
P-V	2.200 b

**Invernadero**

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	102.4000	51.2000	0.0001	*
Error	12	22.0000	1.8333		
Total	14	124.0000			

Sustrato	Media
FC-V	7.0000 a
Aserrín	3.8000 b
P-V	0.6000 c

**Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales. FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1). P-V: perlita- vermiculita (1:1).**

**Cuadro 21.** Análisis de varianza para los tres sustratos en cámara de ambiente controlado (20 °C) a 336 días. FV=fuente de variación GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

**Cámara de ambiente controlado**

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	146.5333	73.2667	0.007	*
Error	12	114.8000	9.5667		
Total	14	261.3333			

Sustrato	Media
FC-V	9.200 a
Aserrín	6.200 b
P-V	1.600 b

**Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales. FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V: perlita-vermiculita (1:1).**

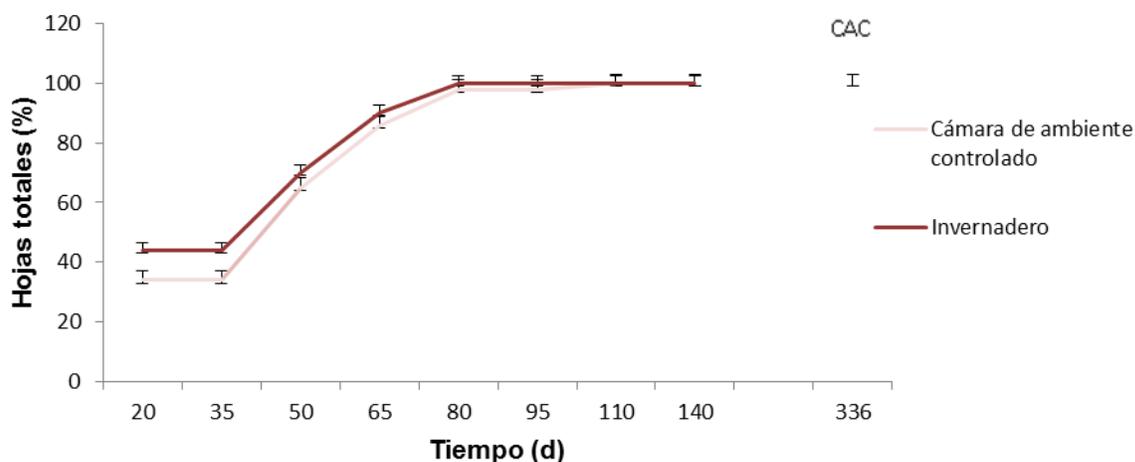
**Cuadro 22.** Supervivencia de plántulas para determinar el mejor sustrato entre ambientes, a los 20, 80, 140 y 336 días, en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24 °C).

Sustratos	20 Días		80 Días		140 Días		336 Días
	CAC	Invernadero	CAC	Invernadero	CAC	Invernadero	CAC
FC-V	10.600 b	9.600 b	9.800 a	7.800 a	9.400 a	7.0000 a	9.200 a
P-V	11.200 b	13.400 b	2.400 b	2.400 b	2.200 b	0.6000 c	1.600 b
Aserrín	16.000 a	16.000 a	10.000 a	4.800 b	9.600 a	3.8000 b	6.200 b

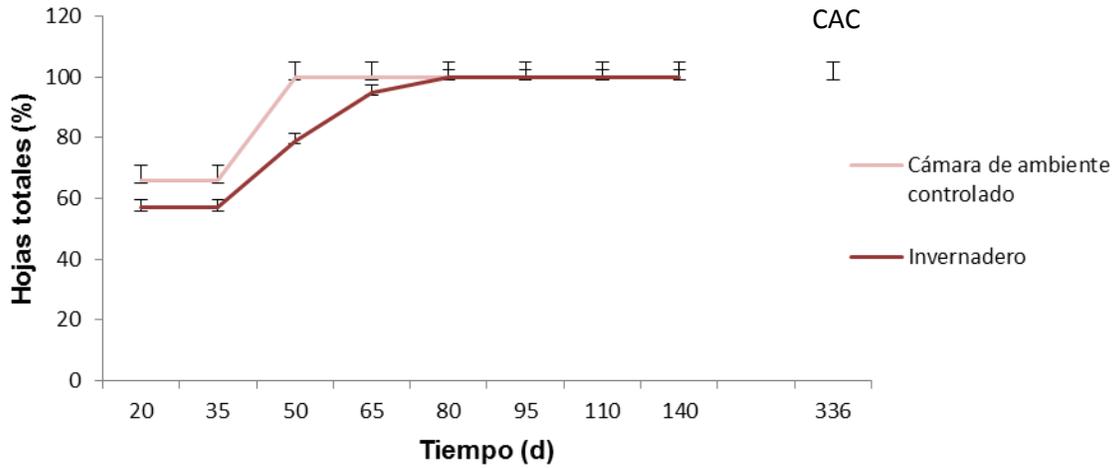
Separación de medias HDS de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales en cada columna CAC: cámara de ambiente controlado (a temperatura promedio de 20 °C) FC-V: fibra de coco- vermiculita (3:1), P-V: perlita- vermiculita (1:1).

### Desarrollo de hojas en el tiempo

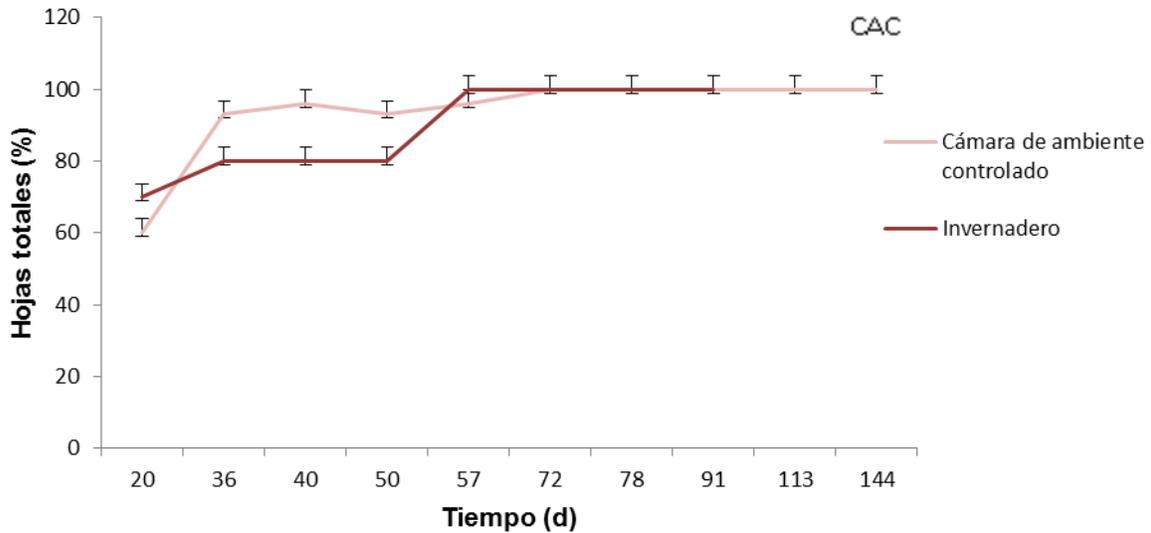
Las plántulas desarrollaron hojas las cuales fueron similares entre sustratos (Figura 21, 22 y 23).



**Figura 21.** Hojas totales (1-3) en fibra de coco-vermiculita (3:1), en este sustrato el mayor número de hojas se formó a partir de los 80 días, en CAC=cámara de ambiente controlado 20 °C e invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, n=100, ‡=barras de error estándar.



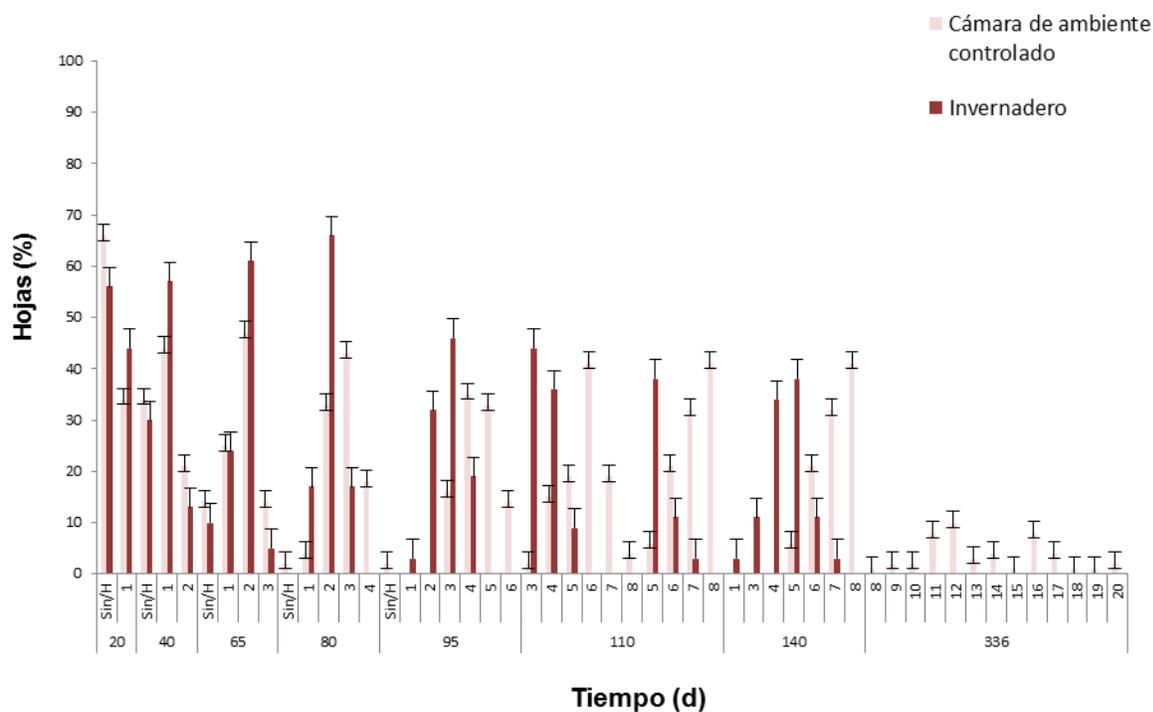
**Figura 22.** Hojas totales (1-3) en perlita-vermiculita (1:1), en este sustrato el mayor número de hojas se formó a partir de los 50 días CAC=cámara de ambiente controlado 20 °C y a los 80 días en invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, n=100, ±=barras de error estándar.



**Figura 23.** Hojas totales (1-3) en aserrín (*Pinus ayacahuite*), en este sustrato el mayor número de hojas se formó a los 80 días CAC=cámara de ambiente controlado a 20 °C y 65 días en el invernadero a temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, n=100±=barras de error estándar.

En las Figuras 21, 22 y 23 se observa que las hojas se desarrollaron en distintos días. El sustrato que presentó el mayor número de hojas (1 y 2) aproximadamente a los 50 días fue la perlita-vermiculita (1:1) bajo condiciones controladas y el resto de los sustratos formaron hojas a los 80 días.

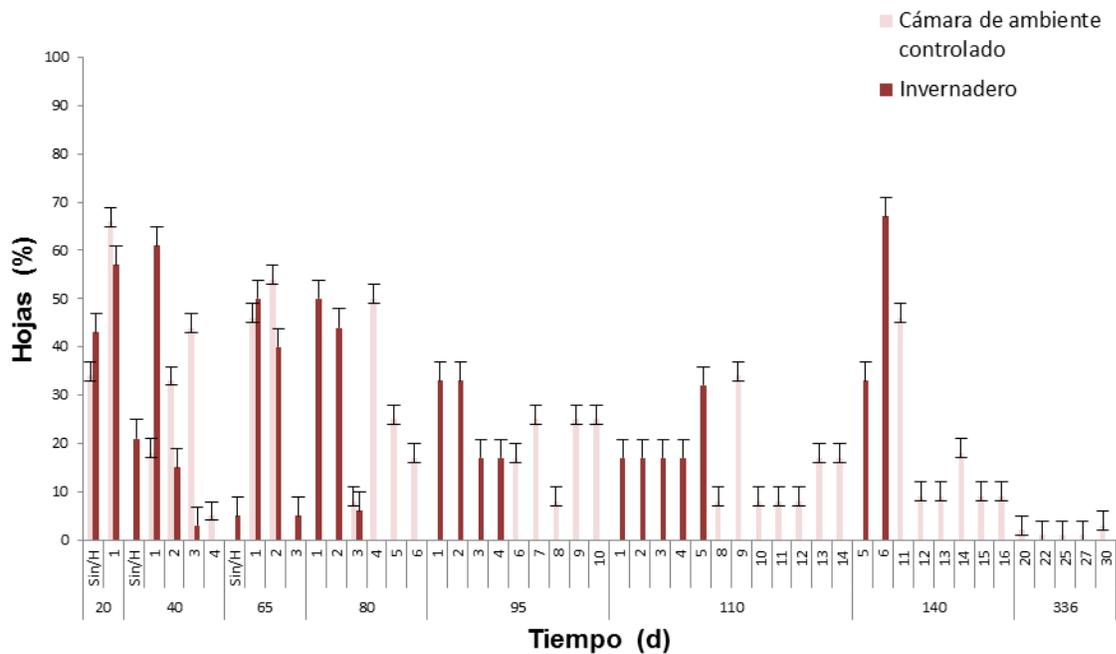
El porcentaje de acuerdo al número de hojas que se formaron en el tiempo y sobre los sustratos, se muestran en las siguientes gráficas:



**Figura 24.** Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato fibra de coco- vermiculita (3:1), n=100, ±=barras de error estándar.

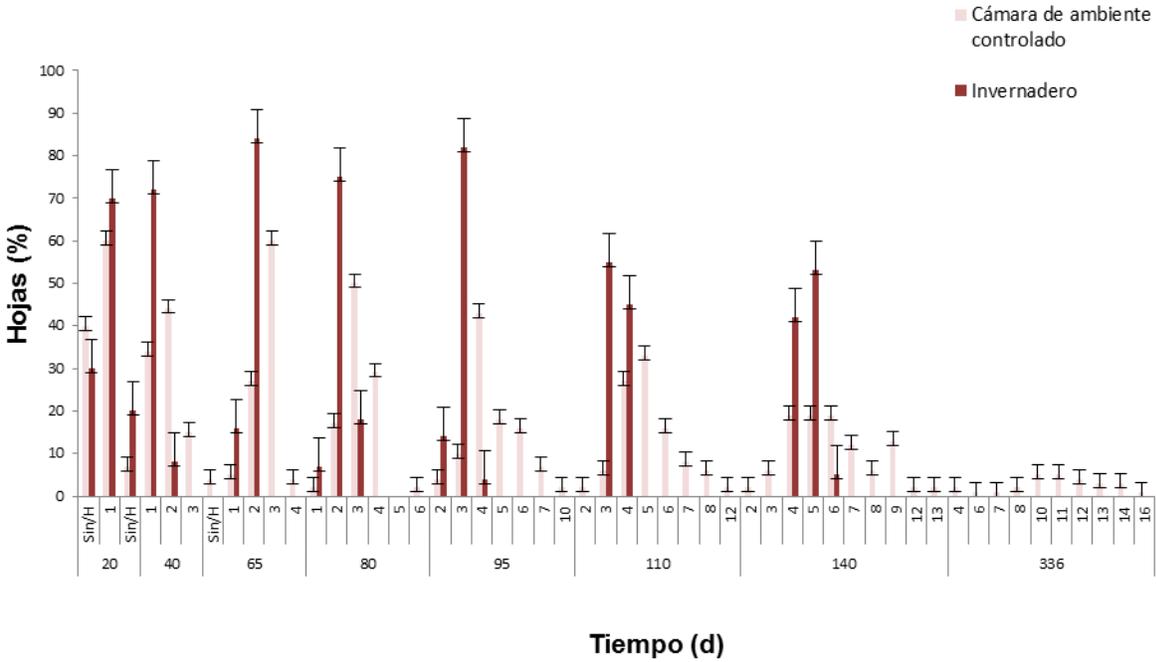
Se inició el desarrollo más rápido, las hojas en el ambiente 2 (Invernadero) a diferencia de las que se encontraban en el ambiente 1 (cámara de ambiente controlado) (Figura 24). Sin embargo, la respuesta cambió a los 140 y 336 días donde el mayor número de

hojas se presentó en el ambiente 1 entre 5-20 hojas por plántula en el ambiente 2 las plántulas contaban entre 5-8 hojas a los 140.



**Figura 25.** Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato perlita-vermiculita (1:1), n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.

El número de hojas en el ambiente 1(cámara de ambiente controlado) a los 140 días fue de 11-16 por plántula. Las plántulas en el ambiente 2(invernadero) contaban con 5 y 6 hojas por plántula, las plántulas del ambiente 1 a los 336 días formaron entre 20 - 30 hojas (Figura 25)



**Figura 26.** Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato aserrín, n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.

En el aserrín el número de hojas que se formó en el ambiente 2 fue entre 2-6 hojas por plántulas a diferencia de las que se encontraban en la cámara de ambiente controlado formaron un mayor número de 2-16 hojas por plántula. No obstante se manifestó un declive en la sobrevivencia, las plántulas del invernadero comenzaron a fenecer y las de la cámara de ambiente controlado, se mantuvieron pero las hojas que se formaron fueron más pequeñas a diferencia de los otros dos sustratos (Figura 26).

## Evaluación del tamaño de plántula.

A los 160 y 336 días, se realizaron las evaluaciones de altura y diámetro de la roseta de *Tillandsia macdougallii* (Cuadro 23-26).

**Cuadro 23.** Análisis de varianza para diámetro de la roseta de plántulas en los 3 sustratos (FC-V, P-V y aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato a los 160 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

### Cámara de ambiente controlado

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	26.7290	13.3645	0.0009	*
Error	24	33.8291	1.4095		
Total	26	60.5581			

Sustrato	Media
P-V	5.6411 a
FC-V	4.3467 a
Aserrín	3.2056 b

### Invernadero

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	30.8815	15.4407	0.0002	*
Error	6	1.8572	0.3095		
Total	8	32.7387			

Sustrato	Media
FC-V	6.7567 a
P-V	3.0833 b
Aserrín	2.6133 b

Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales  
CAC: cámara de ambiente controlado, FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V: perlita-vermiculita (1:1),

**Cuadro 24.** Análisis de varianza para altura de plántula en 3 sustratos (FC-V, P-V y aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato a los 160 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

**Cámara de ambiente controlado**

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	276.0425	138.0212	0.001	*
Error	24	16.1431	6.9643		
Total	26	443.1856			

Sustrato	Media
P-V	12.071 a
FC-V	11.413 a
Aserrín	4.983 b

Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales.  
CAC: cámara de ambiente controlado, FC-V: fibra de coco- vermiculita (3:1), P-V: perlita-vermiculita (1:1).

**Invernadero**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P</b>	<b>SIG</b>
Sustrato	2	9.3623	4.681	0.005	*
Error	6	1.9289	0.3215		
Total	8	11.2916			

<b>Sustrato</b>	<b>Media</b>
<b>FC-V</b>	6.8967 a
<b>P-V</b>	5.5700 a
<b>Aserrín</b>	4.4000 b

**Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales CAC: cámara de ambiente controlado, FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1),P-V: perlita-vermiculita (1:1).**

**Cuadro 25.** Análisis de varianza para diámetro de la roseta en 3 sustratos (FC-V, P-V y aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato hasta los 336 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia  
**Cámara de ambiente controlado**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P</b>	<b>SIG</b>
Sustrato	2	26.7290	13.3644	0.0009	*
Error	24	33.8291	1.4095		
Total	26	60.5581			

<b>Sustrato</b>	<b>Media</b>
<b>P-V</b>	5.6411 a
<b>FC-V</b>	4.3467 ab
<b>Aserrín</b>	3.2056 b

**Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales CAC: cámara de ambiente controlado, FC-V: fibra de coco-vermiculita (3:1),P-V: perlita-vermiculita (1:1).**

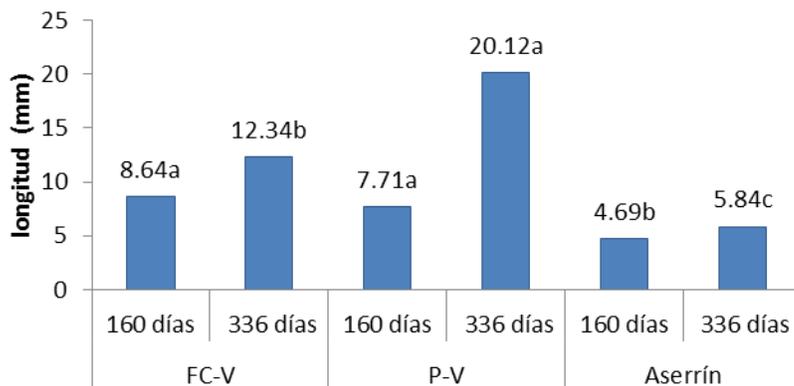
**Cuadro 26.** Análisis de varianza para altura de plántula en los 3 sustratos (FC-V, P-V y Aserrín) en cámara de ambiente controlado (20 °C) y pruebas de Tukey para determinar el mejor sustrato a los 336 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Sustrato	2	848.7693	424.3846	<0.0001	*
Error	27	525.7825	19.4734		
Total	29	1374.5517			

Sustrato	Media
P-V	20.898 a
FC-V	19.535 a
Aserrín	8.995 b

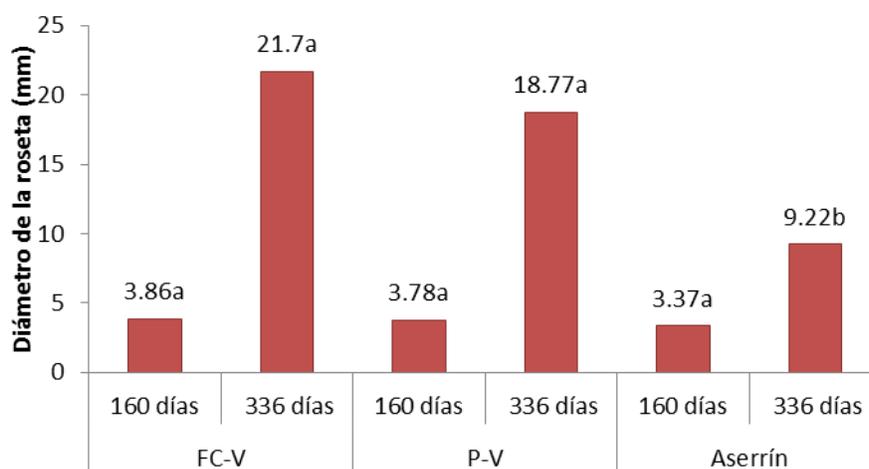
Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales CAC: cámara de ambiente controlado, FC-V: fibra de coco- vermiculita (3:1) P-V: perlita-vermiculita (1:1).

En las siguientes gráficas se muestra el promedio de acuerdo con las pruebas de Tukey en altura y diámetro de la roseta de *Tillandsia macdougallii*.



**Figura 27.** Longitud promedio de plántulas de *Tillandsia macdougallii* por tiempo (días) y sustratos, FC-V= fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V= perlita-vermiculita (1:1), n=20.

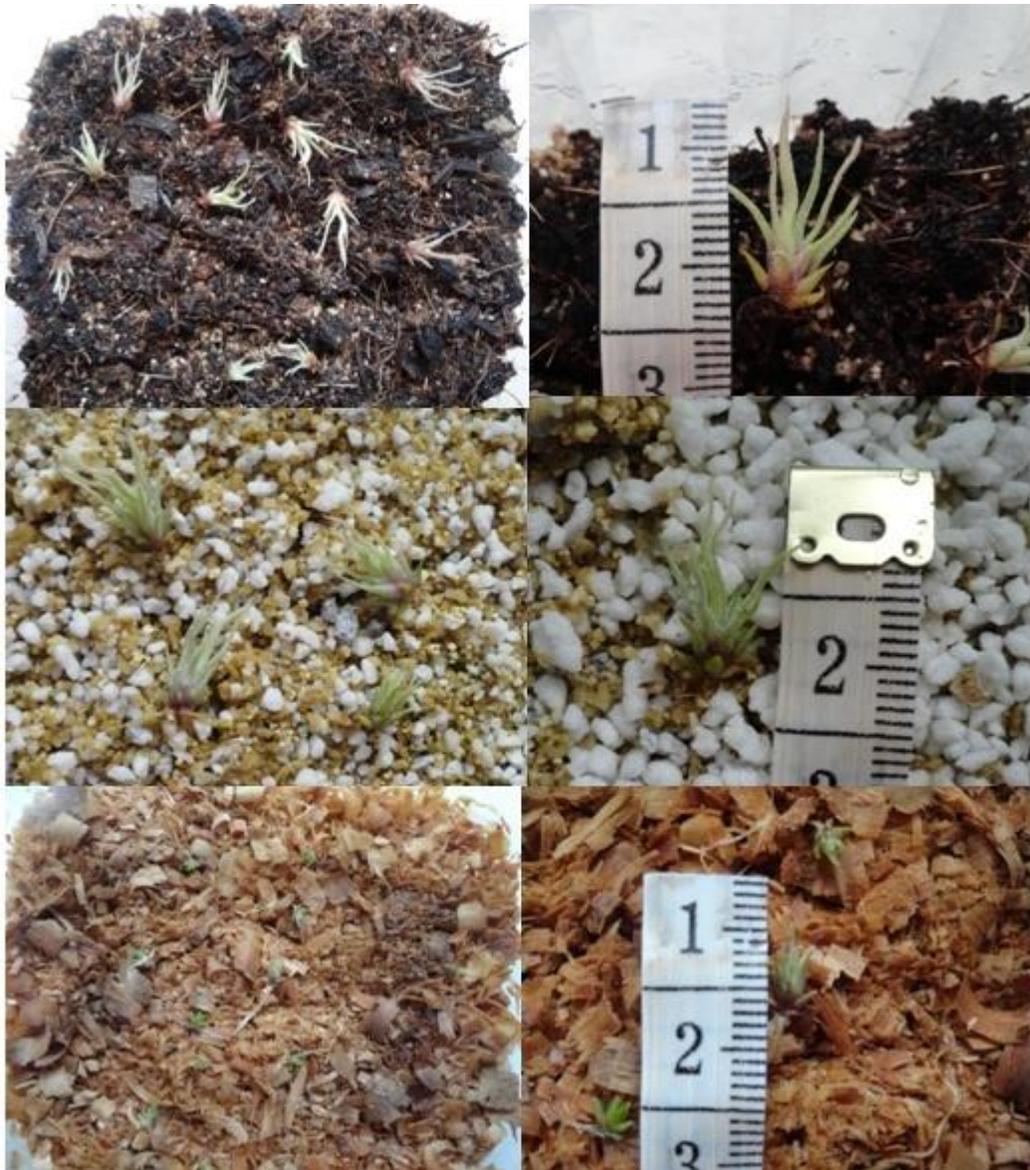
El mayor tamaño (20.12mm) se presentó en el sustrato P-V a los 336 días posteriormente le sigue el sustrato FC-V (12.34 mm), valor menor en altura (4.69 mm) lo presento el aserrín a los 160 días (Figura 27).



**Figura 28.** Promedio del diámetro de la roseta de *Tillandsia macdougallii* por tiempo (d) y sustratos, FC-V=fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V= perlita-vermiculita (1:1), n=20.

El diámetro de la roseta difirió y el mayor lo presento el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) a los 336 días seguido del sustrato perlita-vermiculita (1:1), el menor diámetro se presentó a los 160 días el aserrín. n=20

Con respecto al diámetro de la roseta se tiene que el mayor se presentó en el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) (21.7 mm), a los 336 días, posteriormente le sigue el sustrato perlita-vermiculita (1:1) con 18.77 mm, el valor menor en diámetro lo presento el aserrín con 3.37 mm a los 160 días (Figura 28).



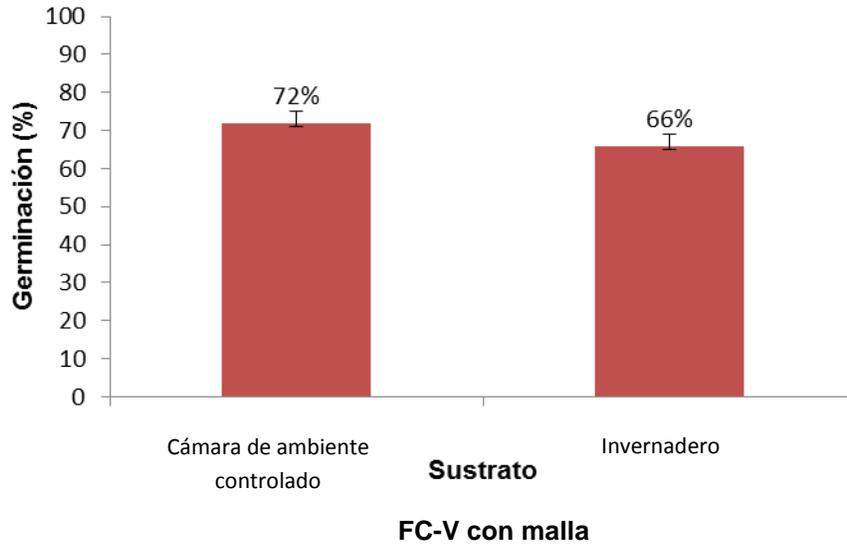
**Figura 29.** Sustratos (fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1) y Aserrín) con plántulas de *Tillandsia macdougallii* en cámara de ambiente controlado (20 °C), a los 160 días de sobrevivencia.



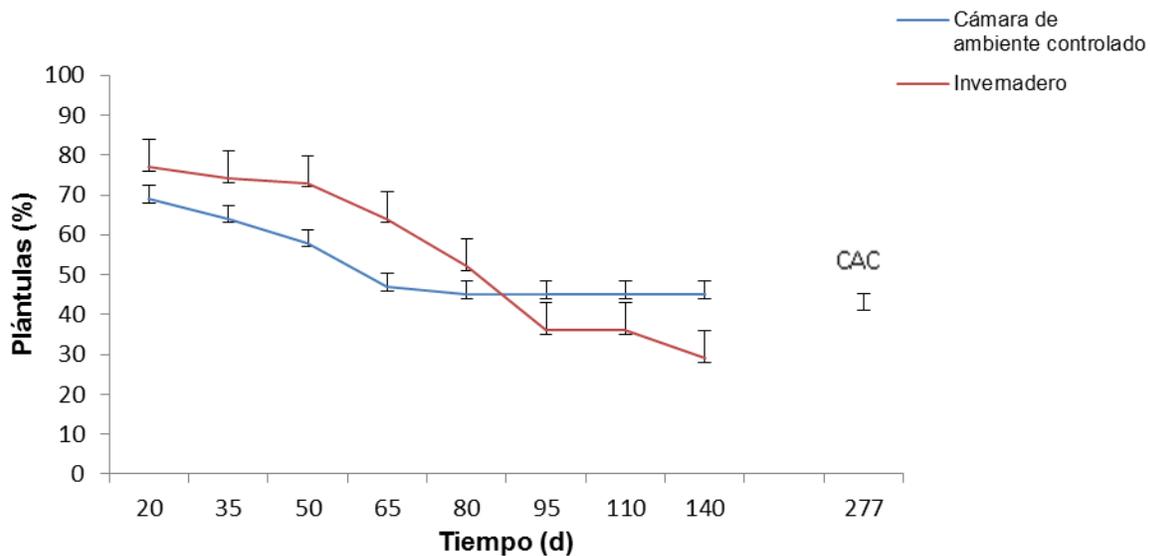
**Figura 30.** Sustratos (fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1) y Aserrín) con plántulas en ambiente de invernadero temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C, a los 160 días de sobrevivencia.

#### **Experimento 4**

Con el objetivo de estudiar la germinación y posterior sobrevivencia en un soporte inerte. Se colocó semilla sobre una malla plástica (antiáfidos) y esta sobre un sustrato de fibra de coco-vermiculita (3:1). Además, con este experimento se disminuyó la manipulación de las plántulas para evitar la contaminación obtenida con el sustrato directo compuesto de fibra de coco-vermiculita (3:1), en las Figura 31 y 32 se presenta el porcentaje de germinación y sobrevivencia se evaluó hasta los 227 días.



**Figura 31.** Porcentaje de germinación a los 10 días después de la siembra, sustrato en sustrato fibra de coco-vermiculita (FC-V) (3:1) con malla, n=100, ‡=barras de error estándar.



**Figura 32.** Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* sobre fibra de coco-vermiculita (3:1) con malla, en CAC (cámara de ambiente controlado, 20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) n=100, ‡=barras de error estándar.

El inicio del experimento fue a los 20 días con un porcentaje de 70 % (cámara de ambiente controlado) y 80 % (Invernadero), a diferencia del sustrato fibra de coco-vermiculita en el que se ensayó el sustrato directo con un porcentaje aproximado del

50 %. Sin embargo, a los 65 días el porcentaje de sobrevivencia entre los dos sustratos fue muy parecido.

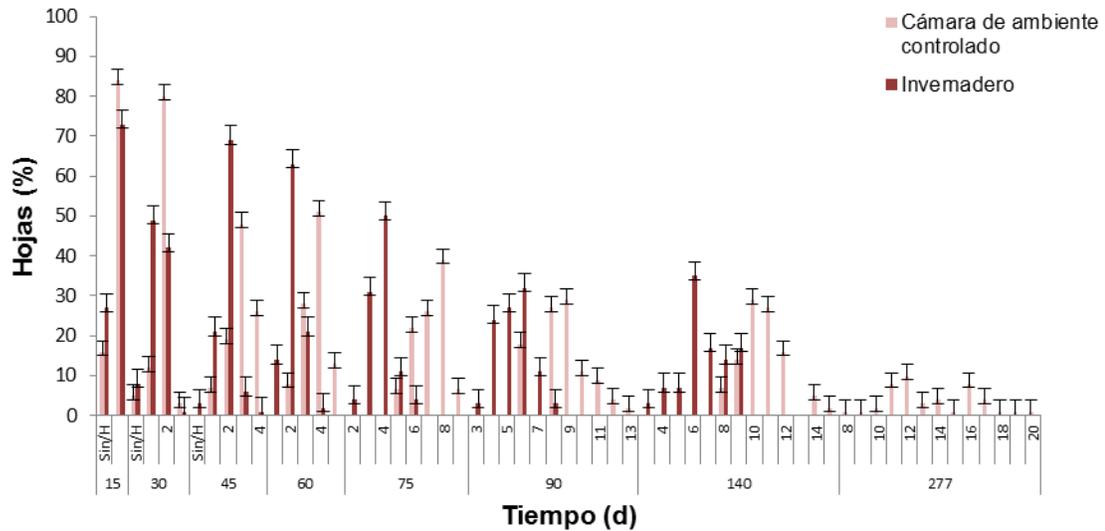
La sobrevivencia tuvo un declive mayor aproximadamente a los 50 días en los dos ambientes, las plántulas de *Tillandsia macdougallii* que mantuvieron un porcentaje más constante fueron las que se encontraban en la cámara de ambiente controlado, contrario a las del invernadero. A los 140 días el sustrato con malla presento un 45 % (cámara de ambiente controlado) y 29 % (invernadero) de sobrevivencia y a los 227 días las plántulas de la cámara de ambiente controlado, mantuvieron 42 % de sobrevivencia (Cuadro 27).

**Cuadro 27.** Análisis de varianza y pruebas de Tukey en el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) con malla para determinar el mejor ambiente (cámara de ambiente controlado (20 °C) e invernadero (temperatura media mínima 14 °C y máxima 24°C) a los 227 días, LG=grados de libertad, SM=Suma de cuadrados, CM=Cuadrados medios, P=probabilidad, SIG=significancia.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>P</b>	<b>SIG</b>
Ambientes	1	178.8020	178.8020	0.0001	*
Error	78	151.0648	1.9367		
Total	79	329.86668			

<b>Sustrato</b>	<b>Media</b>
<b>CAC</b>	8.1433a
<b>Invernadero</b>	5.1533b

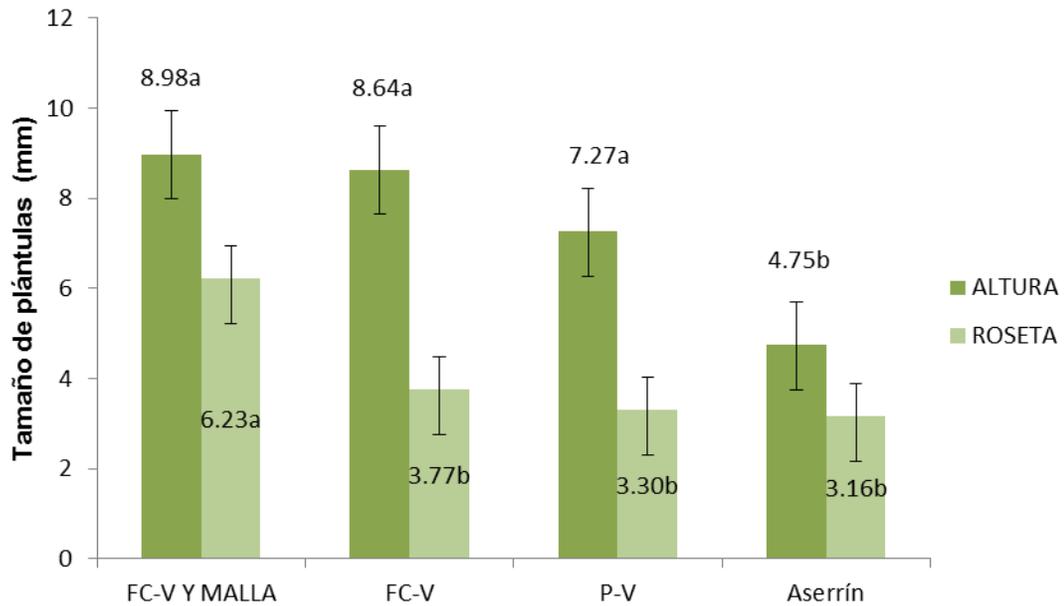
Separación de medias de Tukey (P=0.05) valores con la misma letra son estadísticamente iguales  
CAC: cámara de ambiente controlado.



**Figura 33.** Porcentaje de plántulas con diferente número de hojas desarrolladas en el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) con malla, n=100,  $\pm$ =barras de error estándar.

En el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) con malla, el número de hojas que se formó en el invernadero al igual que en la cámara de ambiente controlado el desarrollo fue constante. No obstante, en el transcurso de los días se manifestó un declive en la sobrevivencia, las plántulas del invernadero comenzaron a fenecer y las de la cámara de ambiente controlado se mantuvieron, pero las hojas que se formaron fueron más pequeñas a diferencia de los otros dos sustratos. El número de hojas que se formaron van desde 2 hasta 20 por plántula (Figura 33).

La longitud y diámetro de la roseta para los 4 sustratos de *T. macdougallii* a los 140 días se presenta en la Figura 34.



**Figura 34.** Medias de Tukey, para altura y diámetro de roseta a los 140 días en los sustratos FC-V=fibra de coco–vermiculita (3:1), P-V=perlita–vermiculita (1:1), aserrín y fibra de coco (FC-V) (3:1) con malla,  $\pm$ =barras de error estándar. n=20.

En la Figura 34 se observa que no hay diferencias significativas entre los tres primeros sustratos, solo con el aserrín en el que las plántulas presentan un menor tamaño. Sin embargo con lo que respecta al diámetro de la roseta el sustrato con malla presento diferencias entre el resto de los sustratos.



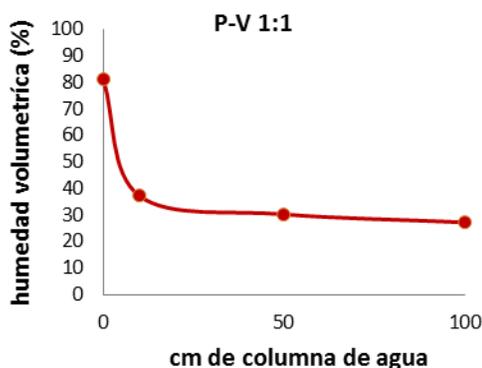
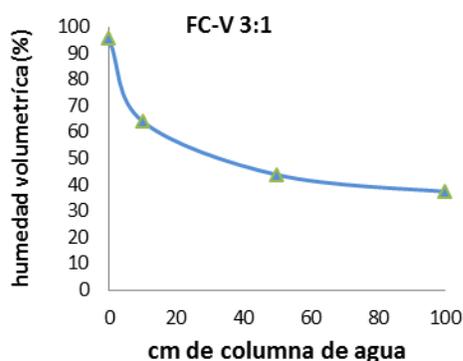
**Figura 35.** Plántulas en sustrato FC-V (3:1) con malla, a los 160 días de sobrevivencia

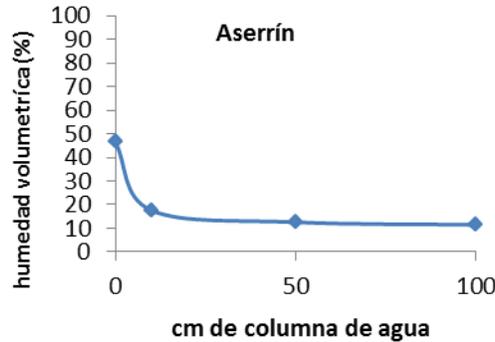
Los resultados positivos de los sustrato fibra de coco- vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1) y aserrín (experimento 3), pueden estar asociados a las características físicas y químicas de los sustratos. El sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1), fue uno de los que mantuvo una sobrevivencia constante, una de las características que presenta la fibra de coco es la elevada aireación, además de presentar un buen porcentaje de retención de humedad, en conjunto con la vermiculita que presenta espacios interlaminares permitió una buena aireación, una de las cualidades que presentan la fibra de coco y la vermiculita es el alto contenido de potasio que en general es uno de los elementos que exigen en mayor cantidad las bromelias, además de que la vermiculita presenta una elevada capacidad de intercambio catiónico, esto quiere decir que se permiten el intercambio de los nutrientes

asimilables por las plantas para su crecimiento, por ello se infiere que estas cualidades de los sustratos permitieron el establecimiento de *Tillandsia macdougallii*. Sin embargo, a pesar de que las características de porosidad y retención de humedad son muy similares entre fibra de coco-vermiculita (3:1) y perlita-vermiculita (1:1), la sobrevivencia fue menor en este último, aunque el crecimiento al final del experimento fue mayor para las plántulas sobrevivientes en este sustrato. Por otro lado el aserrín presenta un porcentaje bajo en aireación y retención de humedad, lo cual tuvo un impacto importante en la sobrevivencia y el desarrollo de las plántulas, además se descompone lentamente debido a los elevados contenidos de lignina y compuestos lignocelulósicos, que pudieron afectar en el crecimiento y sobrevivencia, sin embargo, las plántulas sobrevivieron observándose verdes y saludables.

**Cuadro 28.** Características físicas de los sustratos: FC-V=fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V=perlita-vermiculita (1:1) y Aserrín.

Sustrato	Total de poros (%)	Aireación (%)	Retención de humedad (%)	Densidad aparente
P-V (1:1)	85.75	23.35	56.90	0.11
FC -V (3:1)	78.01	21.04	56.98	0.2
Aserrín	53.85	13.6	13.33	0.14





**Figura 36.** Curvas de retención de humedad en FC-V=fibra de coco-vermiculita (3:1), P-V=perlita-vermiculita (1:1) y aserrín.

**Agua difícilmente disponible (ADD):** es el agua en tanto por ciento en volumen, queda retenida en el sustrato tras aplicar una tensión de 100 cm de columna de agua.

**Agua fácilmente disponible (AFD):** es el tanto por ciento en volumen de agua que se libera entre 10 y 50 cm de tensión en columna de agua.

## 5.6 Discusión

Se realizaron cuatro experimentos con materiales orgánicos e inorgánicos de los cuales, fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1), aserrín y fibra de coco-vermiculita (3:1) y sobre este una malla obtuvo mejores resultados.

En el experimento 1 en el que se utilizó como sustrato: la planta madre, pet moss, carbón, hojas de pino y sus combinaciones, no se pudo realizar ningún análisis estadístico por la contaminación y mortandad de plántulas, que se presentó al siguiente día del trasplante.

En el experimento 2, se probaron cuatro sustratos: carbón, pet moss, vermiculita y piedra pómez, en estos la sobrevivencia fue baja, además de ser muy breve el tiempo

que permanecieron las plántulas en estos cuatro sustratos debido a la contaminación y pérdida de agua de las plántulas. Sin embargo, se corroboró que el uso de sustratos simples no es muy recomendable para el cultivo de esta especie, pero nos dio indicios del material que se pueden utilizar para formar mezclas, que posteriormente ayudaron a obtener mejores resultados.

En el experimento 3, la combinación de sustratos, fibra de coco-vermiculita (3:1), perlita-vermiculita (1:1) y aserrín se observaron que las primeras diferencias significativas fueron a partir de los 20 días de sobrevivencia. El aserrín presentó un 80 % de sobrevivencia a los 20 días, este valor fue muy parecido con lo reportado para la especie *Tillandsia geminiflora* que presentó un 92.4 % de sobrevivencia a los 24 días en aserrín puro en un ambiente protegido con 50 % de luminosidad y 100% de humedad relativa (Stringheta et al., 2005). Sin embargo, a diferencia de esta especie *Tillandsia macdougallii* a los 140 días tuvo un declive y la sobrevivencia fue del 50% a diferencia de *T. geminiflora* que presentó un 78.5% a los 136 días.

Después de 80 días el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) presentó un porcentaje constante del 50 % de sobrevivencia, en cámara de ambiente controlado durante 144 y 336 días. Sin embargo, en el sustrato perlita-vermiculita (1:1) el deceso de plántulas fue drástico en los dos ambientes y los valores fueron desde el 3 y 11 % de sobrevivencia.

Es importante señalar que la sobrevivencia en el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) es comparable con los resultados que se obtuvieron para la especie *Achmea nudicaulis* en sustrato fibra de coco a una temperatura ambiente promedio de 25.8 °C con 70% de sombra el cual obtuvo un porcentaje intermedio de sobrevivencia de 48 % (Anacleto

*et al.*, 2008), muy parecido al porcentaje que alcanzó *T. macdougallii* con valores de germinación de 56 % bajo condiciones controladas y 53 % en el invernadero.

Existen algunos estudios en los que se hace uso de la fibra de coco; por ejemplo para la especie *Dendrobium nobile* cuando la fibra se prepara en diferentes mezclas, tiene efectos significativos en la altura, formación de raíces y peso seco, además de ser un material accesible a diferencia de otros (*Assiset al.*, 2005).

Sin embargo, para las especies *Aechmea constantinii* y *Canistrum alagoanum*, la mezcla de sustratos orgánicos (composta, gabazo de caña, helecho, estiércol de caprino, fibra de coco) no obtuvo diferencias significativas con lo que respecta al desarrollo de las plántulas (Fonseca, 2010)

Se puede considerar que este sustrato es un excelente material de bajo costo que por sus características de retención de humedad y lenta descomposición permite el establecimiento de bromelias.

Por otro lado, a pesar de la baja sobrevivencia en el sustrato perlita-vermiculita (1:1), en él se presentó el mayor tamaño (9.98mm altura y 6.23 mm diámetro) y número de hojas (11 a 16 hojas) en condiciones controladas. El sustrato con menor número de hojas formadas, fue el aserrín (2 a 13). Respecto a la altura de las plántulas este sustrato mostro diferencia significativas a los 336 días de evaluación.

El sustrato con malla permitió inferir, que no causa ningún efecto directo en la sobrevivencia de las plántulas y que otros son los factores que intervienen en ella por ejemplo: la temperatura y humedad relativa.

## 5.7 Conclusiones

La mezcla de materiales favorecen mejor el desarrollo de plántulas de *T. macdougallii*, debido a que estas le proporcionan una mejor condición para su desarrollo.

El mayor porcentaje de germinación (85 %) fue obtenido con semillas sobre sustrato aserrín en cámara de ambiente controlado a los 20 días a una temperatura de 20 °C.

El mejor porcentaje de sobrevivencia a los 140 días se presentó en el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) (48 %) y Aserrín (47 %) en cámara de ambiente controlado, a los 336 días el sustrato fibra de coco-vermiculita (3:1) se mantuvo la sobrevivencia sin contaminación con el mismo porcentaje en cámara de ambiente controlado.

## 5.8 Literatura citada

- Ansorena, M. J. 1994. Sustratos, Propiedades y Caracterización. Mundi Prensa, Madrid. 172p.
- Anacleto, A., Negrelle R. R. & Koehler H. S. 2008. Germinação de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae) em diferentes substratos alternativos aopó de xaxim. *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*. 30 (1): 73-79
- Assis, A. M., R. T. Faria, L. A. Colombo & Carvalho J. F. 2005. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*. 27(2): 255-260
- Barbados, J. L. 2005. Microemprendimiento: Hidroponía. Ed. Albatros SACI. Argentina, Buenos aires. pp. 33-35,41-44. Consulta 30 Octubre 2012. <http://books.google.com.mx/books?id=aa4A0GakMRsC&pg=PA33&dq=sustratos&hl=es419&sa=X&ei=1Sn3T9C7HYWQ2AXPtIDSBg&sqi=2&ved=0CEsQ6AEwBA#v=onepage&q=sustratos&f=false>
- Bodley, W. J. 1998. The Commercial greenhouse. 2a. ed. Del Mar Publishers. Washington, EUA. pp.146-148.
- Burés, S. 1997. Sustratos. Ediciones Agrotécnicas G. L. España, Madrid. pp. 182,189, 238, 243

- De Boodt M, O. Verdonck, I. Cappaert. 1974. Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Horticulturae*. 37:2054-2062.
- Fonseca, P. A. 2010. Caracterização Morfométrica de Frutos e Sementes, Germinação e Produção de Mudanças de *Aechmea constantinii* ((Mez) L. B. Sm., 1970) e *Canistrum alagoanum* Siqueira Filho & Leme, 2002). Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas Universidad Federal de Alagoas. *Centro de Ciências Agrárias*. 92p.
- Miranda, M. J., J. M. Arellanos, B. A. Salazar, F. M. Hernández, R. C. Quero & L. S. Pérez. 2007. Bases para el manejo comunitario de bromelias ornamentales. Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental (GAIA) A.C. Oaxaca, México. 112p.
- Mondragón, D. C.; I. Ramírez-Morillo; M. Flores-Cruz & J. Garcia-Franco. 2011. La familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 98p.
- Sandoval-Bucio, E. N., M. Flores-Cruz & A. Martínez-Bernal. 2004. Bromelias útiles de México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. XLIX 49 (4): 100-115
- Stringheta, A. C., D. J. Silva, A. A. Cardoso, L. E. Fontes & J. G. Barbosa. 2005. Germinação de sementes e sobrevivência das plântulas de *Tillandsia geminiflora* Brongn, em diferentes substratos. *Acta Scientiarum Agronomy Maringá*. 27(1):165-170

CAPITULO VI. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Tillandsia macdougallii* L. B. Sm. y *Tillandsia violacea* Baker (Bromeliaceae)

### 6.1 Resumen

*Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* son especies endémicas de México con potencial ornamental. Sin embargo, la pérdida de su hábitat y la colecta ilegal, han afectado directamente sus poblaciones silvestres. El objetivo de este estudio fue la micropropagación *in vitro* como una estrategia de producción masiva y de conservación. Para la desinfestación de los explantes se utilizó alcohol (96 %), una solución de metalaxil clorotalonii (1 %) e hipoclorito de sodio al (1.8 %). En la primera siembra se colocaron 45 semillas de *T. macdougallii* y 13 semillas de *T. violacea* en tres medios (MG, MT, MB) cada uno contenía sales de Murashige y Skoog y sacarosa (con 10 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup>, 30 g L<sup>-1</sup>) y solo se suplemento con 1.25 mg L<sup>-1</sup> de 6-Benciladenina (BA) el medio MT y 4 mg L<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) y 0.3 mg L<sup>-1</sup> ácido indolacético (AIA) el medio MB. Las evaluaciones se realizaron durante 115 días. En la segunda siembra, se colocaron 53 semillas de *T. violacea* en medio MG y se evaluó durante 65 días. En la tercera siembra se colocaron 50 semillas de *T. macdougallii* en medios MS al 25, 50 y 100 % de su concentración original. Se trasplantaron a los dos meses en los medios: MA (2mg L<sup>-1</sup> (BAP) y 0.1mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalacético (ANA)), MY (2mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.5mg L<sup>-1</sup> ANA) yMTDZ (2mg L<sup>-1</sup> de tidhiazuron (TDZ)). Los resultados de la desinfestación permitieron obtener un 90% de explantes sin contaminación. En la primer siembra se obtuvo un 80 % de germinación para *T. macdougallii* y 15% para *T. violacea*, el porcentaje de sobrevivencia en MB

para *T. macdougallii* fue 44% y *T. violacea* 33 % por 90 días. En la segunda siembra el mejor porcentaje de germinación lo obtuvo el medio MG (46 %) y sobrevivieron el 25 % de plántulas. En la tercera siembra el mayor porcentaje de germinación (90 %) y sobrevivencia (22 %) ocurrió en el medio MS al 50 % por 80 días. El medio en el que se desarrolló un mayor número de hojas (9 por plántula) fue el MTDZ y el medio que permitió el mayor porcentaje de brotes adventicios fue el medio MA (52 %). Esta investigación ayudara a establecer posteriores protocolos que permitirán la producción masiva de las especies en estudio.

**Palabras clave:** Murashige skoog, Thidiazuron, crecimiento, brotes

## 6.2 Abstract

*Tillandsia macdougallii* and *Tillandsia violacea* are endemic species from Mexico with ornamental potential. However, the losses of their habitat and illegal collecting have directly affected their wild populations. The objective of this study was the micro propagation *in vitro* as a strategy of massive production as well as preservation. To disinfectate the explants, alcohol (96 %), a solution of metalaxil clorotalonii (1 %) and sodium hypochlorite at (18 %) were used. In the first sowing, 45 *Tillandsia macdougallii* seeds and 13 *Tillandsia violacea* seeds were put in 3 mediums (MG, MT, MB), each of which contained Murashige and Skoog salts and saccharose (with 10 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup>, 30 g L<sup>-1</sup>) and it was supplemented with 1.25 mg L<sup>-1</sup> of 6- Benzyl adenine (BA) in medium MT and 4mg L<sup>-1</sup> of Benzylaminopurine (BAP) as well as 0.3 mg L<sup>-1</sup> Indoleacetic Acid (AIA) en medium MB. The evaluations were done during 115 days. In the second sowing, 53 *Tillandsia violacea* seeds were put in medium MG and the evaluation lasted

65 days. In the third sowing, 50 *Tillandsia macdougallii* seeds were put in medium MS at 25, 50 and 100 %. They were transplanted after two months in the mediums: MA (2mg L<sup>-1</sup> (BAP) and 0.1mg of naftalacetic acid (ANA)), MY (2mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0.5mg L<sup>-1</sup> ANA) and MTDZ (2mg L<sup>-1</sup> of tidhiazuron (TDZ)). The results of the disinfection allowed obtaining a 90% of explants without contamination. In the first sowing, an 80 % of germination for *Tillandsia macdougallii* and a 15 % of it for *Tillandsia violacea* were obtained; the percentage of survival in MB for *Tillandsia macdougallii* was 44 % and that of *Tillandsia violacea* was 33 % for 90 days. In the second sowing, the best percentage of germination occurred in medium MG (46 %) and 25 % of the seedlings survived. In the third sowing, the highest percentages of germination (90 %) and survival (22 %) occurred in medium MS at 50 % for 80 days. MTDZ was the medium in which a greater number of leaves developed (9 per seedling) and the medium that allowed the highest percentage of adventitious shoots was the medium MA (52 %). This investigation will help to establish further protocols that allow the massive production of the species in studying.

### 6.3 Introducción

Las bromelias junto con otras especies constituyen el principal componente epífita vascular de casi todos los tipos de vegetación en México. Los encinares, las selvas caducifolias y los bosques mesófilos, contribuyen en gran medida a su alta diversidad biológica (Espejo-Serna *et al.*, 2007).

Por su diversidad morfológica y gran belleza, las bromelias han alcanzado una importancia extraordinaria en diversas partes del mundo como plantas de ornato

(Negrelle, 2012). En México en algunas regiones de los estados de Oaxaca, Veracruz y Chiapas, son utilizadas como adorno o para ceremonias religiosas. Sin embargo, la extracción intensiva y la destrucción de su hábitat ha ocasionado una fuerte disminución de las poblaciones silvestres (Mondragón *et al.*, 2011).

Así como en otras especies de plantas, las bromelias se reproducen por dos vías: la sexual, en la que el fruto (cápsula) genera una gran cantidad de semillas (100 a 150) y en la asexual se desarrollan generalmente de 4 a 8 hijuelos por planta. En ambos casos el crecimiento es lento, aproximadamente de 4 a 6 años para alcanzar la madurez fisiológica (Rauh, 1979; Pardo, 2004).

Las técnicas de cultivo de tejidos como la micropropagación ofrecen ventajas sobre la propagación convencional, ya que permite producir un gran número de plantas a partir de un segmento pequeño de tejido en corto tiempo y un espacio significativamente reducido. En el caso de las orquídeas la mayor ventaja del cultivo de tejidos es que permite que las semillas germinen exitosamente y que a su vez sean una fuente de tejido a partir del cual se pueden generar una gran cantidad de plantas. Otras ventajas de la micropropagación es la clonación de un genotipo seleccionado y mayor control sanitario del material que se propaga (Abdelnour-Esquivel y Vincent, 1994).

La micropropagación de bromelias se ha considerado una técnica importante para optimizar la producción de estas plantas y satisfacer el mercado ornamental. Trabajos de micropropagación con estas especies se han llevado a cabo en *Tillandsia eizii* (Pickens *et al.*, 2006), *Orthophytum grossiorum* (Manfio *et al.*, 2010), *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch (Santos *et al.*, 2010), *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.*,

2010), *Billbergia rosea* (Pardo *et al.*, 2008), *Orthophytum mucugense* (Lima *et al.*, 2012), *Dyckia distachya* (Pompelli y Guerra, 2005), *Nidularium fulgens* Lem. Oliveira *et al.*, 2009), *Aechmea fasciata* (Huang *et al.*, 2011). Otras especies que tienen importancia ornamental y que además están en peligro de extinción como *Aechmea veitchii* (Baker) y *Racinaea crispa* (Baker) (Calderón–Arias *et al.*, 2011), *Puya santossi* (Pedroza 2008) *Vriesea splendens* var. *splendens* (Pardo *et al.*, 2010) *Vriesea reitzii* Leme (Alves *et al.*, 2006).

En la actualidad es necesario buscar alternativas de propagación de bromelias, que permitan aprovechar de manera sustentable las especies silvestres. Una opción viable para las especies de esta familia, es la multiplicación masiva. Es decir técnicas de cultivo *in vitro* que permitan satisfacer la demanda local del mercado en el país, además de ser una estrategia para reducir la sobre explotación y la recuperación de especies en peligro de extinción.

Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo estudiar la germinación y propagación *in vitro* de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* especies silvestres y endémicas de México con potencial ornamental.

## 6.4 Materiales y métodos

### Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* colectadas en los municipios de Tlalmanalco y Temascaltepec, Estado de México. La investigación se

llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioquímica de Semillas, del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

Se realizaron 3 experimentos (siembras) siguiendo la metodología que se describe a continuación.

### **1ra. SIEMBRA**

Cuarenta y cinco semillas de *Tillandsia macdougallii* de la localidad “Las juntas” del Municipio de Temascaltepec y trece semillas de *Tillandsia violacea* de la localidad “Dos Aguas” del Municipio de Tlalmanalco, fueron seleccionadas con la testa de color pardo claro.

#### **Desinfestación del material vegetal**

Previo a la siembra de las semillas se procedió a su desinfestación, para lo cual se sumergieron en alcohol (96 %) por 90 segundos, después en una solución fungicida al 1 % (Ridomil ®, metalaxil y clorotalonil) y se mantuvieron por 20 minutos, para luego tratarlas con hipoclorito de sodio al (1.8 % de cloro activo) durante 25 minutos. Finalmente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada. Las semillas se colocaron en dos medios de cultivo MG y MT.

**Medio de germinación (MG).** Se preparó con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962) más  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa.

**Medio de inducción de brotes adventicios (MT).** Consistió en las sales de Murashige y Skoog,  $20 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa y  $1.25 \text{ mg L}^{-1}$  de 6- benciladenina (BA).

**Medio de desarrollo (MB).** Contenía las sales de Murashige y Skoog más  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa,  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de Bencilaminopurina (BAP) y  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  ácido indolacético (AIA).

Todos los medios fueron ajustados a  $\text{pH } 5.7 \pm 0.1$  y se agregaron  $2 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel antes de esterilizarlos a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  en una autoclave.

## **2da. SIEMBRA**

Se colectaron frutos abiertos de *Tillandsia violacea*, el 19 de junio de 2011 y la siembra de treinta y cinco semillas se realizó el día 30 noviembre de 2011. Fueron desinfectadas de acuerdo al procedimiento antes descrito y se colocaron en el medio MG.

## **3er. SIEMBRA**

Las semillas de *Tillandsia macdougallii* (150) se repartieron y colocaron en medios elaborados con las sales de Murashige y Skoog al 25, 50 y 100 % de su concentración original. Los medios fueron suplementados con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, el pH se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$  y se les agregaron  $2 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel, luego se esterilizaron por 25 minutos en autoclave.

Al cabo de dos meses y con el propósito de estudiar el potencial de regeneración vía organogénesis, se evaluó el efecto de distintos medios de cultivo preparados con las sales de MS al 25 %, 50 % y 100 % suplementado con diferentes reguladores de crecimiento, los cuales se describen a continuación:

Se preparó con sales MS al 50 % (2.2 g L<sup>-1</sup>) y se suplemento con 30g de sacarosa y 2g L<sup>-1</sup> de phytigel, los tres medios contenían estas sales solo se les suplemento de la siguiente manera:

**Medio MA.** Se suplementó con 2mg L<sup>-1</sup> de Bencilaminopurina (BAP) y 0.1mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalacético (ANA).

**Medio MY.** Se agregaron 2mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.5mg L<sup>-1</sup> ANA.

**Medio TDZ.** Contenía 2mg L<sup>-1</sup> de tidhiazuron (TDZ).

Las plántulas emergidas se transfirieron dos veces cada cuatro semanas al respectivo medio de cultivo por cuatro meses. Finalmente, las plántulas fueron cultivadas en los medios antes mencionados pero sin reguladores de crecimiento.

### **Variables evaluadas**

Se evaluó el porcentaje de germinación, sobrevivencia, hojas desarrolladas y brotes. Además de la altura y ancho de plántulas.

## **6.5 Resultados**

El protocolo de desinfestación utilizado para las semillas de las especies *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* permitió obtener 90 % de germinación, libres de contaminación por 30 días.

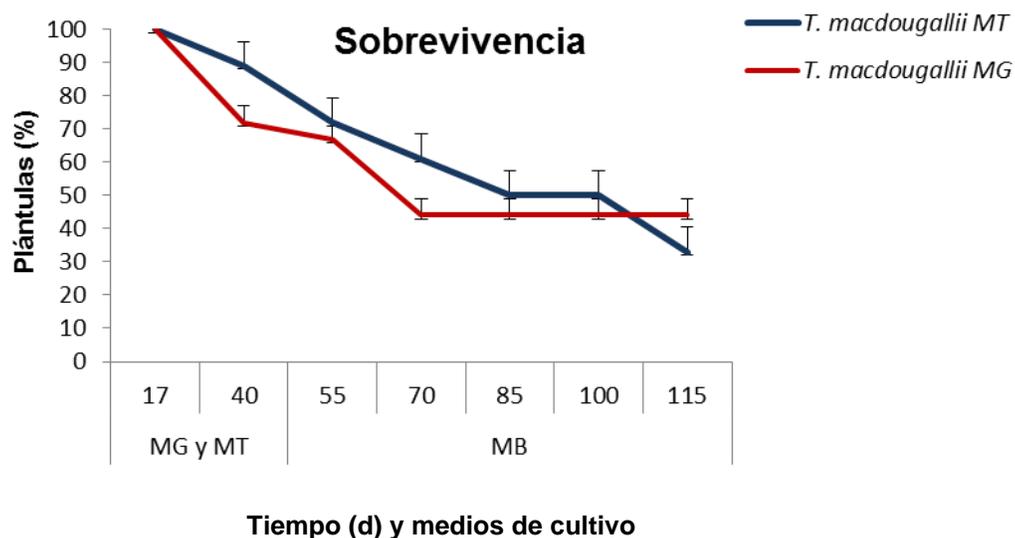
## 1er. SIEMBRA

### Germinación

El porcentaje de germinación para las semillas de *T. macdougallii* fue de 80 % a los 4 días, y para *T. violacea* fue de 15 % a los 8 días.

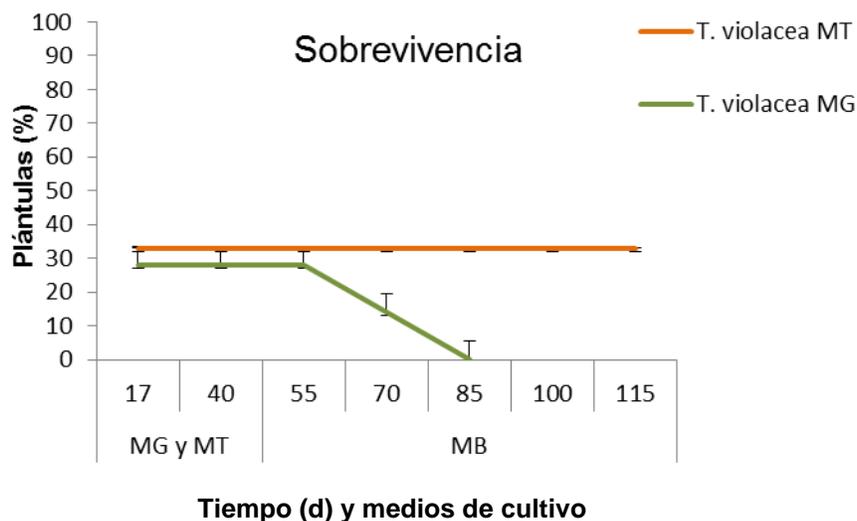
### Sobrevivencia

En cuanto a la sobrevivencia de las plántulas de *T. macdougallii* al cultivarlas en los medios de germinación (MG) (sin reguladores) y de inducción de brotes MT (1.25 mg L<sup>-1</sup>, BAP), cuando estas fueron transferidas al medio MB se estabilizó la sobrevivencia, las plántulas que estaban en el medio MG se mantuvieron vivas. Sin embargo, las que se encontraban en MT fueron feneciendo paulatinamente durante 115 días como se muestra en la Figura 37.



**Figura 37.** Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de *T. macdougallii* cultivadas en los medios MG=medio germinación, MT=medio de inducción de brotes adventicios y, MB=medio de desarrollo, ‡=barras de error estándar.

Por otro lado, en las plántulas de *T. violacea* se mantuvo la sobrevivencia en el medio de cultivo MT, a diferencia de las plántulas que se desarrollaron en MG que mostraron un deceso drástico cuando estas fueron transplantadas en MB, como se muestra en la Figura38



**Figura 38.** Porcentaje de sobrevivencia de plántulas después de 17 días, *T. violacea* cultivadas en los medios MG=medio germinación, MT=medio de inducción de brotes adventicio y MB=medio de desarrollo, ‡=barras de error estándar.

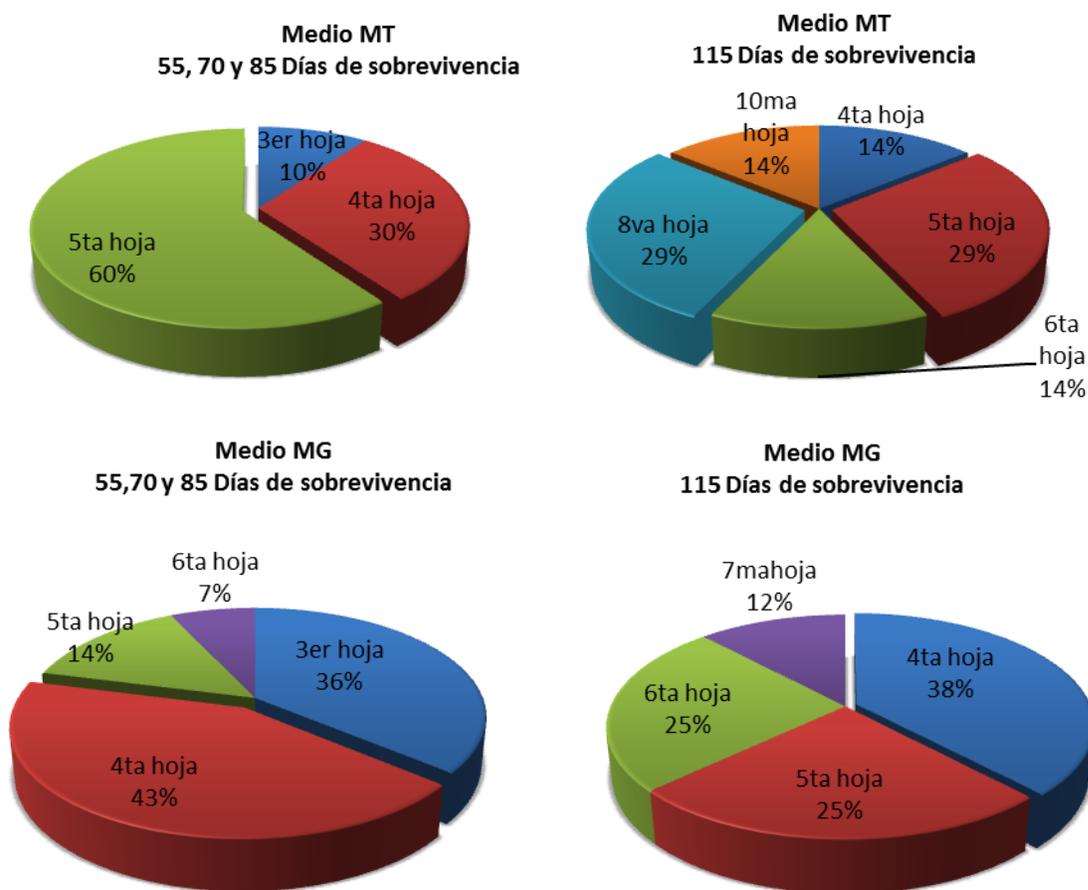
### Porcentaje de hojas desarrolladas en MT y MG

Las plántulas de *T. macdougallii* crecidas en el medio MT formaron de 3 a 5 hojas entre los 55 y 100 días, al cabo de 115 días el número aumentó de 4 a 10. Cabe señalar que en el medio MG las plántulas desarrollaron menos hojas (4 a 8) a los 115 días.

Por otra parte las plántulas de *T. violacea* formaron de 4 y 6 hojas después de 100 días de cultivarlas en el medio MT y a los 115 días las plantas mostraban de 7 a 10 hojas. En

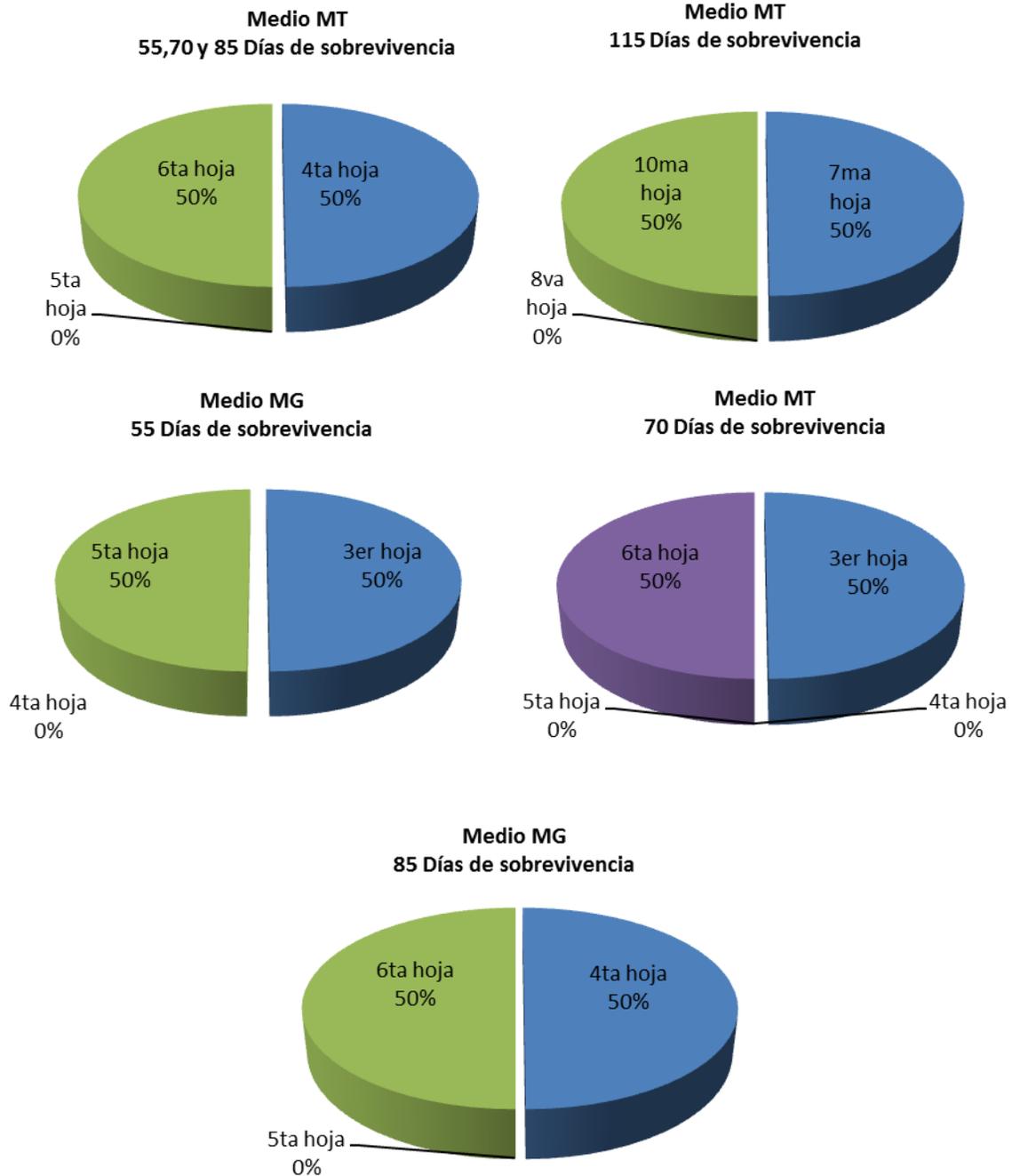
contraste, con las plántulas crecidas en el medio MG que formaron de 3 a 6 hojas y su periodo de vida fue más corto de 85 días. Los porcentajes del desarrollo de las hojas se muestran en las Figuras 39 y 40.

*Tillandsia macdougallii*



**Figura 39.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. macdougallii* crecidas en los medios: MG=medio germinación (Sales MS 100 %), MT= medio de inducción de brotes adventicios (1.25 mg L<sup>-1</sup> BA).

*Tillandsia violacea*



**Figura 40.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. violacea* crecidas en los medios: MG=medio germinación (Sales MS 100%), MT= medio de inducción de brotes adventicios (1.25 mg L<sup>-1</sup> BA).

## **Formación de brotes**

De un total de 22 plántulas de *Tillandsia macdougallii* que crecieron en el medio MT, 3 generaron 3.3 brotes en promedio, esto representa el 14 %, de plántulas con brotes desarrollados, en contraste en el medio MG que formo en promedio 1 brote que representa el 4 % de las plántulas que lo formo.

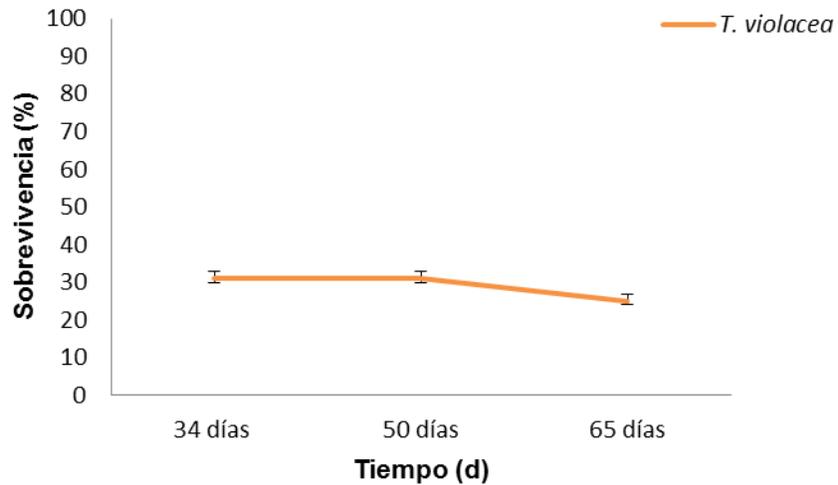
## **2da. SIEMBRA**

### **Germinación**

El porcentaje de germinación de *Tillandsia violacea* a los 10 días en medio MG fue 46 % (16 semillas de un total de 35 semillas).

### **Sobrevivencia**

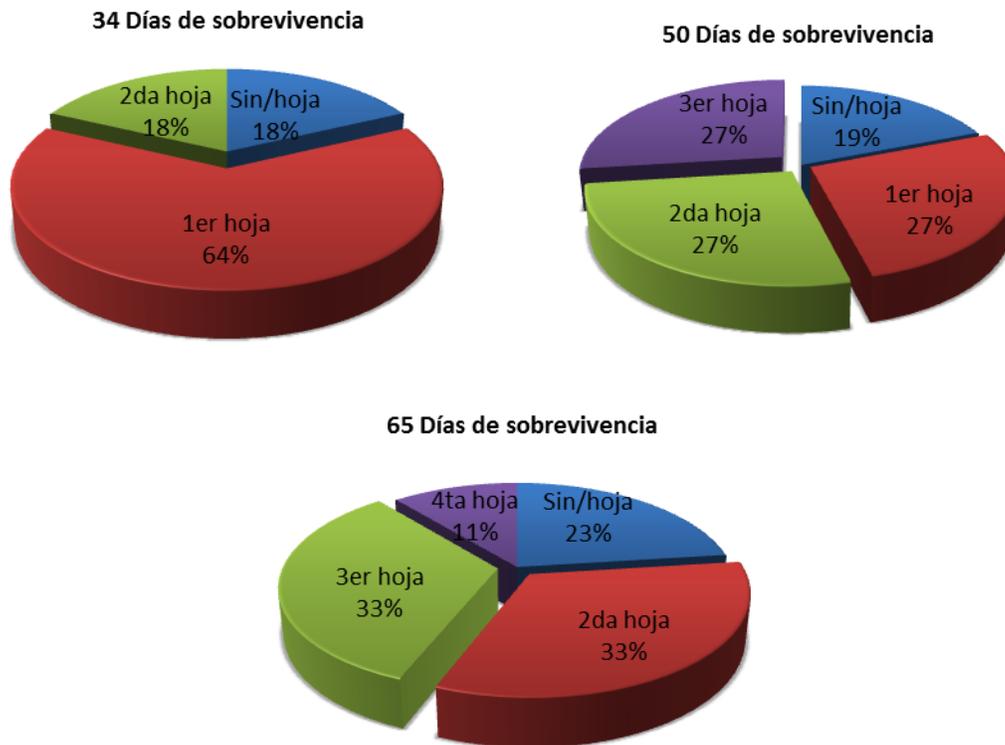
A los 34 días de cultivo sólo 11 plántulas (31 %) desarrolladas en el medio MG permanecían vivas, este porcentaje se mantuvo constante hasta los 50 días, momento en el cual la sobrevivencia comenzó a descender hasta llegar a 25 % (9 plántulas) después de 65 días (Figura 41).



**Figura 41.** Porcentaje de sobrevivencia de 35 plántulas de *Tillandsia violacea* después de 34 días cultivadas en el medio MG= medio germinación (Sales MS 100 %), durante 65 días, ±= barras de error estándar..

### **Porcentaje de hojas desarrolladas en *Tillandsia violacea***

Las plántulas formaron la primera y segunda hojas en los primero 34 días de cultivo en medio MG, después de 50 días ya habían formado la tercera hoja y a los 65 días ya era posible observar plantas con cuatro hojas (Figura 42).

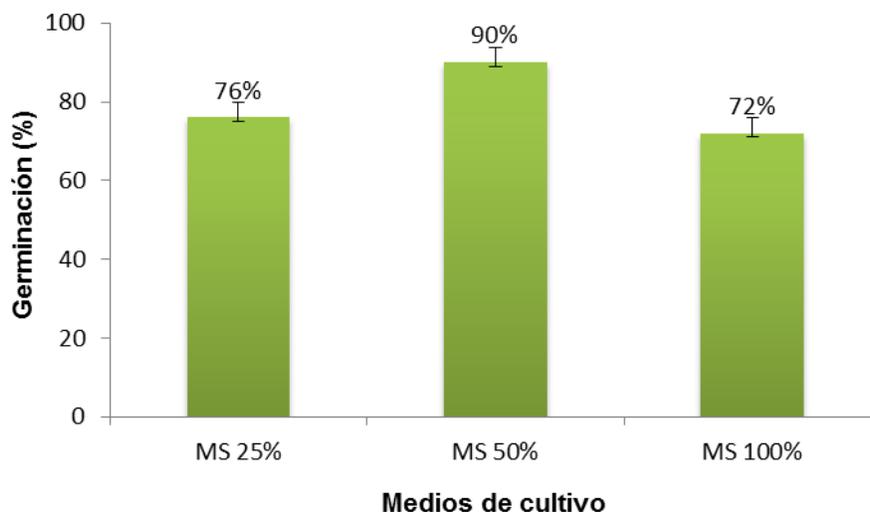


**Figura 42.** Porcentaje de hojas desarrolladas en *T. violacea* durante 65 días de sobrevivencia, en medio de cultivo MG= medio germinación (Sales MS 100 %).

### 3er. SIEMBRA

#### Germinación en tres concentraciones de MS

Con el propósito de estudiar los requerimientos de sales minerales para la germinación y sobrevivencia de las plántulas de la especie *T. macdougallii*, se evaluaron tres concentraciones de las sales basales MS (25, 50 y 100 %). Los resultados muestran que el mayor porcentaje de germinación (90 %) ocurrió en el medio MS al 50 % de su concentración, mientras la menor proporción de semillas germinadas se presentó en el medio MS al 100 % (72 %) (Figura 43).



**Figura 43.** Porcentaje de germinación de las semillas de *T. macdougallii*, después de 10 días de cultivarlas en los medios MS al 25 %, 50 % y 100 % de su concentración original. n=50, ‡=barras de error estándar.

### Sobrevivencia

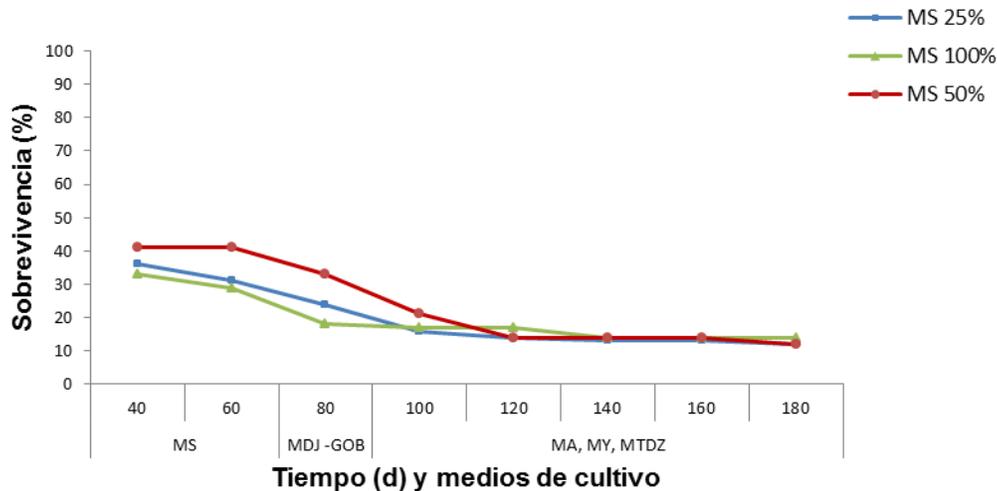
La sobrevivencia de las plántulas a los 60 y 80 días se muestra en el Cuadro 29.

**Cuadro 29.** Porcentaje de sobrevivencia a los 60 y 80 días de *Tillandsia macdougallii* en tres concentraciones de sales basales MS (25, 50 y 100 %)

PORCENTAJE DESOBREVIVENCIA		
MEDIO MS	60 DÍAS	80 DÍAS
MS 25 %	21 %	16 %
MS 50 %	27 %	22 %
MS 100 %	19 %	12 %

La sobrevivencia de plántulas en los medios con las concentraciones de 25, 50 y 100 % de sales de medio MS fue descendiendo paulatinamente hasta los 100 días, en tanto que la sobrevivencia para MS 50 % fue de 40 %, para MS 25 % y MS 100 % fue de 30 % (Figura44). A partir de los 80 días cuando las plantas fueron transferidas a

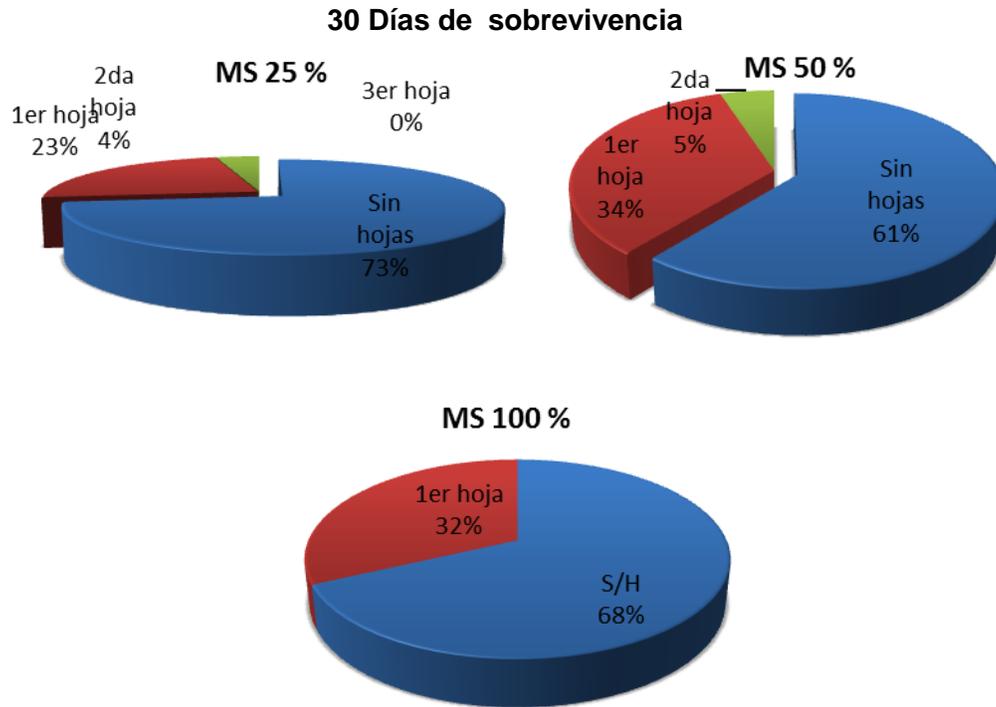
los medios MA, MY y MTDZ para inducir la formación de brotes, la sobrevivencia de éstas fue constante (30 %) en los tres tratamientos hasta los 180 días.



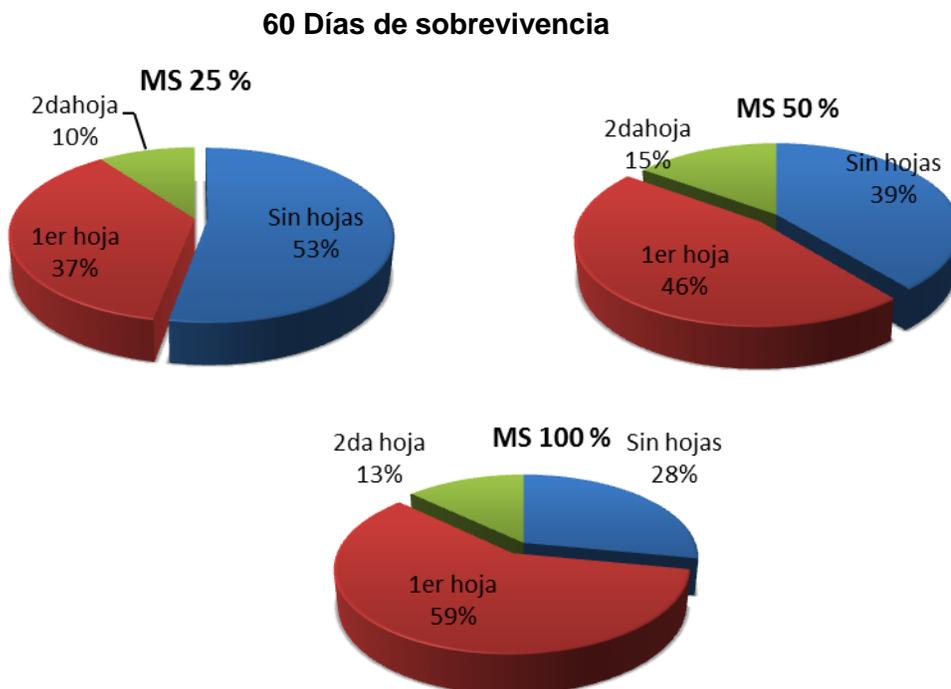
**Figura 44.** Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de *T. macdougallii* en tres concentraciones de MS (25, 50 y 100 %) y su posterior cultivo en los medios: **MA**=BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, n=50.

### Porcentaje de hojas en tres concentraciones de medio MS

Durante los primeros 80 días de cultivo las plantas que permanecieron en el medio MS 25 % formaron hasta 3 hojas, las que crecieron en el medio MS 50 % 4 hojas y las cultivadas en el MS 100 % 5 hojas (Figura 45, 46 y 47).

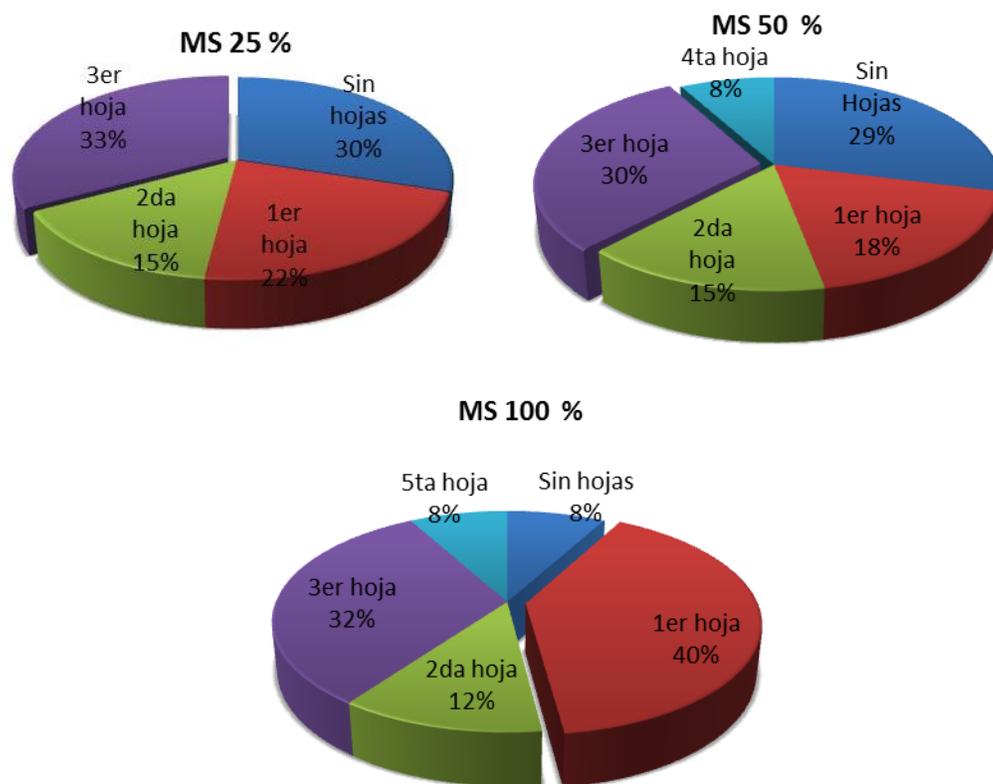


**Figura 45.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. macdougallii* cultivadas en los medios MS 25 %, 50 % y 100 % durante 30 días



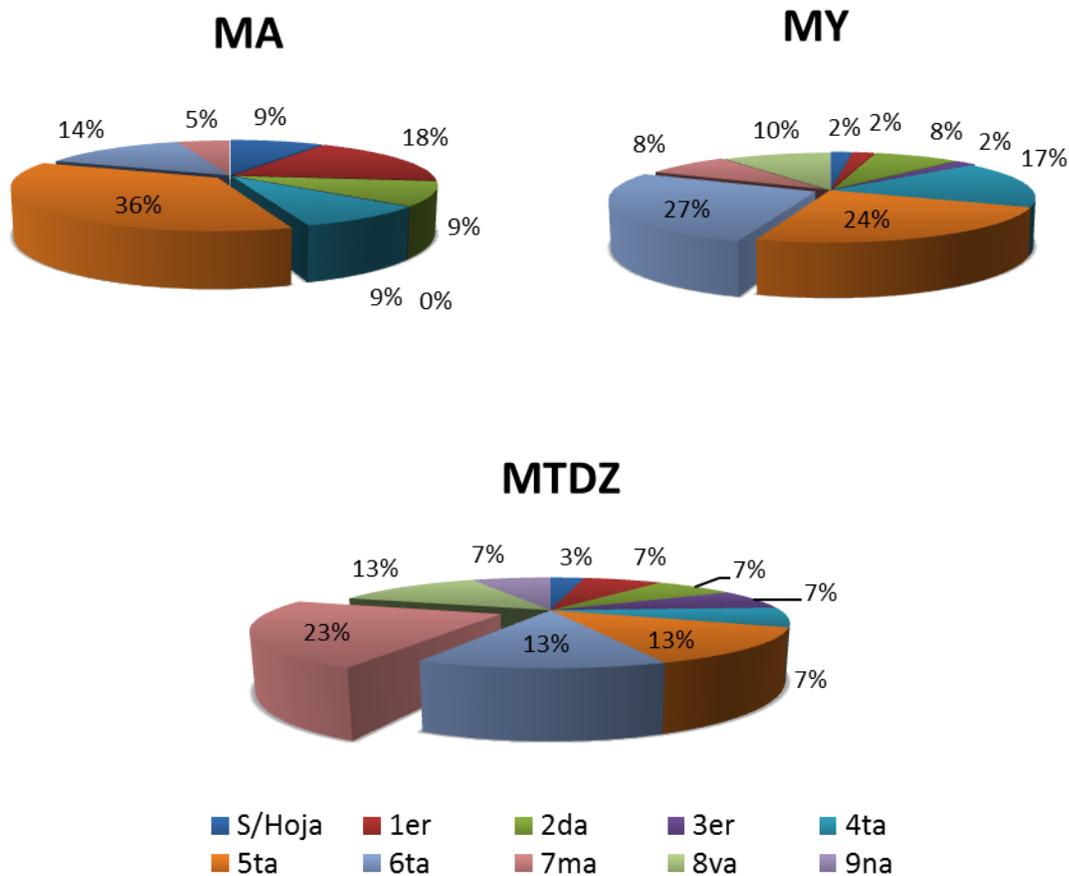
**Figura 46.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. macdougallii* cultivadas en los medios MS 25 %, 50 % y 100 % durante 60 días.

### 80 Días de sobrevivencia



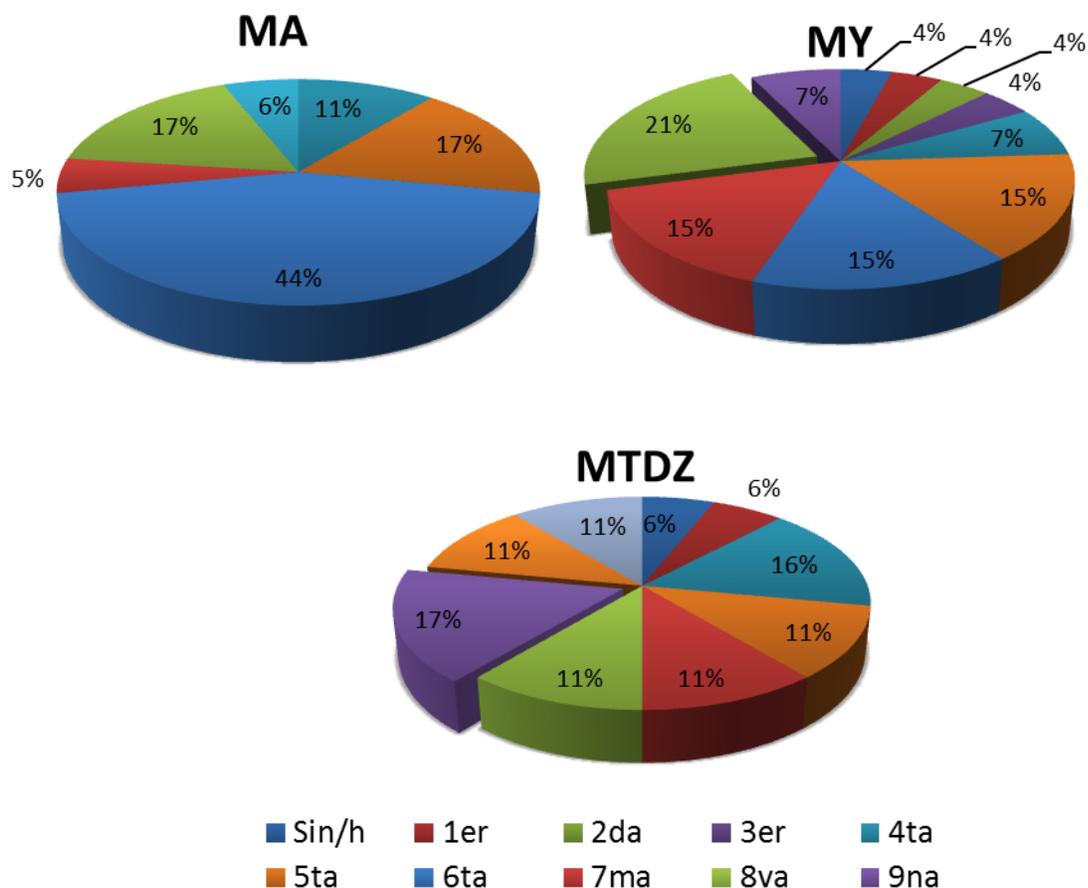
**Figura 47.** Porcentaje de hojas formadas en plántulas de *T. macdougallii* cultivadas en los medios MS 25 %, 50 % y 100 % durante 80 días.

Cuando las plantas se cambiaron a los distintos medios de inducción de brotes MA, MY y MTDZ, formaron más hojas. El medio MTDZ que contenía  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de thidiazuron indujo la mayor cantidad de hojas (9 por plántula) después de 100 días de cultivo y el medio MA el número más bajo (5 hojas por plántula) (Figura 48).



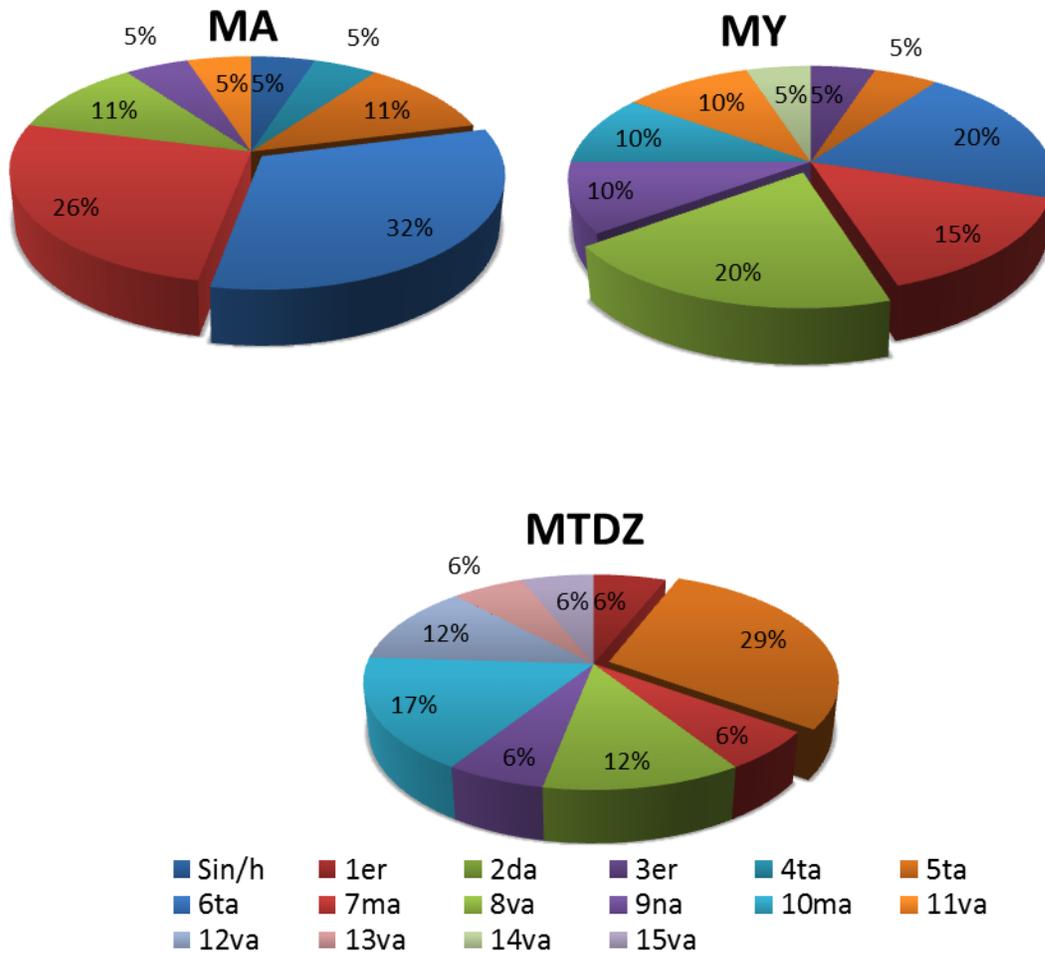
**Figura 48.** Porcentaje de hojas desarrolladas por las plántula de *T. macdougallii* después de 100 días de cultivo en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, n=50.

A los 140 días el número hojas aumentó, las plántulas siguieron siendo favorecidas por la presencia del TDZ, estas eran más grandes un tamaño en promedio de 2.6 cm a diferencia de MA que presento 1 cm y MY 1.3 cm. El color verde fue más intenso en TDZ que en los medios MA y MY. El TDZ permitió que las plantas desarrollaran hasta 12 hojas al final de este periodo de tiempo (Figura 13).



**Figura 49.** Porcentaje de hojas desarrolladas por las plantas de *T. macdougallii* después de 140 días de cultivo en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron.

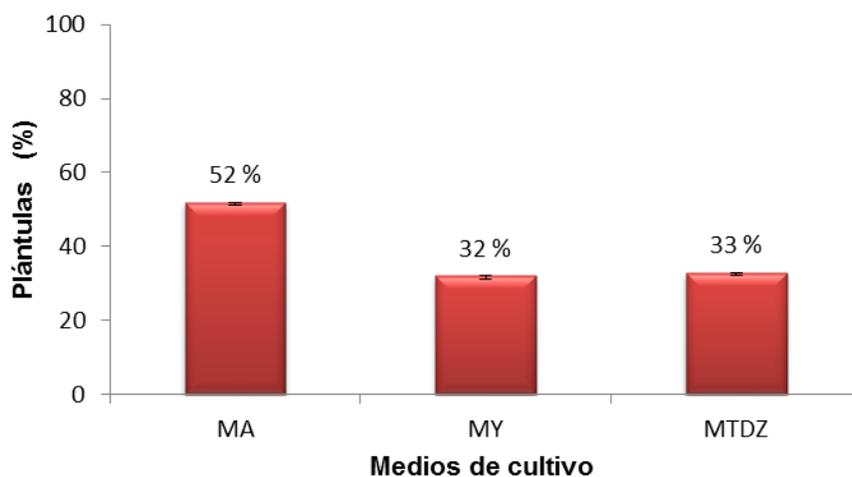
A los 180 días de cultivo el total de hojas formadas en TDZ fue de 5 a 15, las del medio MA formaron de 4 a 11 hojas y las que se cultivaron en medio MY mostraban de 3 a 14 (Figura 50).



**Figura 50.** Porcentaje de hojas desarrolladas por plántulas de *T. macdougallii* después de 180 días de cultivo en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, n=150.

### Número de brotes

El porcentaje más alto de plantas que formaron brotes adventicios después de 140 días de cultivo se encontró en el medio MA (52 %) (Figura51).



**Figura 51.** Porcentaje de plantas de *Tillandsia macdougallii* que formaron brotes después de 140 días de ser cultivadas en los medios: **MA**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.1mg L<sup>-1</sup>, **MY**= BAP 2mg L<sup>-1</sup>, ANA 0.5mg L<sup>-1</sup> y **MTDZ**= 2mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron, ‡=barras de error estándar.

### Tamaño de plántula

El análisis de los resultados no muestra diferencias estadísticas significativas para diámetro de la roseta y para altura de las plántulas de *T. macdougallii* ( $P \geq 0.05$ ) (Cuadros 30 y 31).

**Cuadro30.** Análisis de varianza para diámetro de roseta.

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	1.02	0.51	0.1157	NS
Error	42	9.47	0.23		
Total	44	10.49			

**Cuadro31.** Análisis de varianza para altura de plántula.

FV	GL	SC	CM	P	SIG
Tratamiento	2	0.04	0.02	0.7707	NS
Error	45	3.58	0.08		
Total	47	3.62			

## 6.6 Discusión

Los ensayos previos permitieron hacer un buen manejo de la contaminación en cada uno de los cultivos en estudio. Las semillas, a pesar de ser de plantas silvestres donde los niveles de contaminación son muy altos, se logró un buen control sanitario. Conforme trascurrieron los días en cultivo, el índice de mortandad fue en aumento, debido principalmente a la oxidación de las plántulas. De acuerdo a Hernández (2001) la oxidación es producto de compuestos fenólicos que normalmente son almacenados en vacuolas, peroxisomas y vesículas que son secretadas como un mecanismo de defensa al haber ruptura de las células; estos compuestos se disuelven y causan la inactivación de las enzimas ocasionando necrosamiento. En general la sobrevivencia de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* no se extendió a más de 115 días. Cabe señalar que la tasa de sobrevivencia para *T. violacea* fue menor que las semillas de *Tillandsia macdougallii* lo cual pudo deberse a la diferencia de calidad de las semillas. Se observó que *T. violacea*, presentaba simientes más deterioradas y envejecidas, en comparación con *T. macdougallii*. Sin embargo las semillas de *T. macdougallii* aún conservaban su viabilidad después de 5 meses de almacenamiento.

Para las semillas de *Tillandsia macdougallii* se probaron tres concentraciones de MS, obteniendo el mayor porcentaje de germinación (90 %) en el medio MS al 50 % de su concentración original. Estos resultados coinciden con los reportados para otras bromelias como *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa* en las que se obtuvo 100 y 87 %

de germinación, respectivamente, con la misma concentración de sales (Calderon-Arias *et al.*, 2011).

El efecto del TDZ en el desarrollo de las plántulas de *Tillandsia macdougallii* fue muy notorio. Una de las características que se presentó en éstas fue la coloración de la roseta, la cual mostraba un verde intenso. Asimismo, el TDZ promovió la formación de mayor número de hojas que en los medios MA y MY. El TDZ es una fenilurea sustituida (N-phehil-N-1, 2 3-thidiazol-5-ilurea) que es usado como un herbicida sintético y como un regulador de crecimiento para plantas, éste posee alta capacidad para estimular la proliferación de brotes axilares y adventicios; además es capaz de promover el crecimiento debido a su actividad biológica similar a la de una citocinina.

El medio que indujo el mayor número de brotes (siembra 3) fue el MA (2mg L<sup>-1</sup> BAP, 0.1mg L<sup>-1</sup> ANA) (52 % brotes) De acuerdo con lo reportado en otros estudios en los que a medida que se aumenta la concentración de BAP se aprecia una disminución en la longitud de los brotes y un incremento su proliferación (Pedroza-Manrique *et al.* 2008; Manfio *et al.* 2010) seguido de los medios MY y MTDZ.

## 6.7 Conclusiones

La capacidad de germinación en las semillas de *T. macdougallii* fue mayor que las de *T. violacea*. El medio MS a la mitad de su concentración promovió los valores más altos de germinación y sobrevivencia de las plántulas de *T. macdougallii*. La oxidación de los tejidos afectó la sobrevivencia de las plántulas y evitó evaluar su comportamiento por más tiempo. El TDZ tuvo un efecto positivo en el desarrollo de las plántulas de *T. macdougallii* por lo que podría ser un buen candidato para la propagación *in vitro* de esta especie. Se requieren más estudios para definir las condiciones que permitan la micropropagación exitosa de las especies en estudio.

## 6.8 Literatura citada

- Abdelnour-Esquivel, A. & J. Vincent-Escalant. Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. CATIE. 38p. [en línea].1994. [Enero 2013]. Disponible en la web: <http://books.google.com.mx/books?id=T9QOAQAIAAJ&printsec=frontcover&dq=conceptos+basicos+del+cultivo+de+tejido&hl=es&sa=X&ei=B3cqUbGrBYW32wXArIHQCQ&ved=0CCsQ6AEwAA>
- Alves, G. M., L. L. Vesco & M. P. Guerra.2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*. 110: 204–207.
- Calderón-Arias, A. M., A. Restrepo-Gómez & A. I. Urrea-Trujillo. 2011. Morfogénesis *in vitro* a partir de yemas apicales y bases de hojas de las especies de bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*. *Actualidades Biológicas*. 33 (94): 17-33.
- Calderón-Oliva, E. E. 2008. Clonación *in vivo* de tres especies del género *Tillandsia* (*Tillandsia pruinosa*, *Tillandsia magnusiana* y *Tillandsia streptophylla*) en vías de extinción y de potencial uso sustentable. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Guatemala. 90 p.
- Filho, A. R. L. L. Vesco & M. P. Guerra. 2009. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from atlantic forest. *Ciência Rural*. 39(3):909-912.

- García, N & Betancur, J. 2002. Dos especies nuevas de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de la Cordillera Oriental de Colombia. *Caldasia*. 24(1):1-7.
- Hernández, A. Establecimiento *in vitro* de *Bambus avulgaris* (Bambú amarillo). Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. 2001. 24p.
- Huang, P. L., L. Li-Jen, T. Chi-Chu & L. Zin-Huang. H. 2011. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 105:73–78.
- Lima, C. O., M. N. Marchi, A. Lima-Brito, C. E. Carneiro, M. C. Bellintani, & J. R Santana. 2012. Organogênese direta de *Orthophytum mucugense*. *Ciência Rural*. 42(2):249-254.
- Manfio, C. E., S. Y. Motoike, C. C. Paula, M. S. Valente & C. G. Melo. 2010. Early selection of elite clones of an ornamental bromeliad *in vitro*. *Ciência Rural*. 40(7):1537-1544.
- Mondragón, D. C., I. Ramírez-Morillo, M. Flores-Cruz & J. Garcia-Franco. 2011. La familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. Estado de México. 98 p.
- Murthy, B. N. S., S. J. Murch & P. K. Saxena. 1998. Thidiazuron: Potent regulator of *in vitro*. *Plant morphogenesis*. 34:267-275.
- Negrelle, R. R., D. Mitchell & A. Anacleto. 2012. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 34(1):91-100.
- Pardo, R.A. "Subgénero *Tillandsia* en Venezuela, Asociación Venezolana de Bromeliología (AVBRO)", [en línea]. 2007. [17 de mayo de 2013]. Disponible en la Web: <http://avbro.atwebpages.com/AVBRO/paginas/articulo1.htm>
- Pardo, A., M. Da Costa, G. Alvarado & J. Lorbes. 2010. Conservación *in vitro* de *Vriesea splendens* var. *Splendens* (bromeliaceae). *Centro de Investigaciones Biológicas*. 44 (3): 317-330
- Pardo, A. C. Michelangeli, N. Mogollón & G. Alvarado. 2008. Regeneración *in vitro* de *Billbergia rosea* hortus ex beer a partir de ápices caulinares. *Centro de Investigaciones Biológicas*. 42(4):491-505.
- Paiva, P. D., V. C. Naves, L. F. Dutra, R. Paiva & M. Pasqual. 2009. Propagación *in vitro* de *Nidularium fulgens* Lem. *Interciencia*. 34(8):593-596.
- Pedroso, A. N., R. Lazarini, V. Tamaki, & C. Nievola. 2010. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Revista Brasileira Botanica*. 33(3): 407-414.
- Pedroza-Manrique, J. A. P. & A. Bejarano-Tibocha. 2008. Propagación *in vitro* de *Puya santossi*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10(001):36-48.

- Pickens, K. A., J. Wolf, J. M. Affolter & H. Y. Wetzstein. 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.-Plant.*42:348–353.
- Pompelli, M. F. & M. P. Guerra. 2005. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop Breeding and Applied Biotechnology.* 5:117-124.
- Rauh, W. 1979. Bromeliads for Home, Garden and Greenhouse. Blendford Press. London, England. 431p.
- Santos, D. S., V. Tamaki & C. C. Nievola. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology.-Plant.* 46:524–529.

## CAPITULO VII. DISCUSIÓN GENERAL

Las semillas de las especies en estudio mostraron diferencias entre los porcentajes de viabilidad y germinación. Las de *Tillandsia macdougallii* presentaron una viabilidad de 72 % y una germinación de 98 % (localidad “Las Juntas”) y 84 % de germinación en la localidad de CICITEC-IPN. En las de *T. violacea* se obtuvo un 10 % y 13 % respectivamente (Localidad “Dos aguas”). Esta última información se relaciona con los bajos porcentajes de germinación que se obtuvieron para *T. violacea* de Oaxaca (15.2 %) (Sosa-Luría *et al.*, 2012).

Las semillas de *Tillandsia macdougallii* en el sustrato aserrín presentaron una germinación de 85% y en cultivo *in vitro* en la primer siembra el porcentaje de germinación fue 80% en *T. macdougallii* y 15% en semillas de *T. violacea*. De la misma manera el tiempo de germinación fue similar entre estas dos, mientras que para *T. macdougallii* en sustrato la germinación se dio en 6 días para *T. violacea* fueron 10 días, en cultivo *in vitro* se dio a los 4 y 8 días respectivamente.

Uno de los sustratos que permitió el establecimiento de *T. macdougallii* fue la fibra de coco-vermiculita (3:1) este presento el 50% de sobrevivencia a los 140 días, en comparación con la siembra 3 en cultivo *in vitro* este porcentaje fue menor 14% a los 140 días. De acuerdo con esta información se debe considerar que la etapa de plántula es el lapso en que un vegetal es más vulnerable al efecto de limitaciones meteorológicas, agentes bióticos, daño mecánico y competencia (Camacho, 2011).

El periodo de sobrevivencia en sustratos fue mayor (336 días) a diferencia del cultivo *in vitro* que fue de 180 días, la oxidación de los tejidos no permitió la sobrevivencia de las plántulas.

En cuanto al tamaño de plántulas el sustrato FC-V (3:1) mostro en promedio 8.64 mm de longitud y 3.71mm de ancho, estos resultados coinciden con lo reportado por Marinho de Assis *et al.*,(2005) que demostró que el sustrato fibra de coco es favorable para el crecimiento de la especie *Dendrobium nobile*, (Orquideacea) argumentando que si se combinan fibra de coco en cubos y fibra de coco en polvo, el crecimiento es mayor, debido a que se tiene una mejor aireación y retención de humedad en el sustrato.

*T. macdougallii* presento diferencias significativas, en cuanto al número de hojas (11 a 16), en el sustrato perlita-vermiculita (1:1), esta respuesta se infiere fue porque al mantenerse de manera directa las hojas en el sustrato este permitió que se adsorbieran los nutrientes del fertilizante orgánico que se habían aplicado previamente con el riego. Tomando en cuenta que la vermiculita presenta una elevada capacidad de intercambio catiónico, es decir que los nutrientes adsorbidos por este material se encuentran disponibles y son liberados paulatinamente y de esta manera fueron aprovechados por las plántulas de *T. macdougallii* (Burés, 1997). Sin embargo, la mezcla de estos dos materiales presento el crecimiento de algas que afecto la sobrevivencia de numerosas plántulas, debido a factores como: el color blanco de la perlita que al combinarse con un exceso de humedad, iluminación y temperatura, favorecieron las condiciones necesarias para el establecimiento de estos organismos, que generaron competencia entre las plántulas de *T. macdougallii*.

En tanto que el número de hojas (9 por plántula) que se presentó en el medio de cultivo enriquecido con thidiazuron a los 140 días fue menor, que en sustratos.

Las características físicas en un sustrato son importantes para el establecimiento de plantas cultivadas y los valores óptimos establecidos de acuerdo con Ansorena *et al.*, (1994) son los siguientes: Densidad aparente <0.7, porcentaje total de poros >85, porosidad de aireación 10-30, porosidad de retención de humedad 55-70. Teniendo estos valores como referencia podemos decir que los sustratos que cumplieron con estos valores son las mezclas de fibra de coco-vermiculita (3:1) y la perlita-vermiculita (1:1), que mostraron su eficiencia al mantener una sobrevivencia constante y un crecimiento óptimo en las plántulas de *T. macdougallii*.

En la tercera siembra en cultivo *in vitro* los resultados mostraron que el mayor porcentaje de germinación (90 %) ocurrió en el medio MS al 50% de su concentración. Esta respuesta fue parecida a lo reportado para las especies *Billbergia rosea* con 95% (Pardo *et al.*, 2007) y *Vriesea splendens var. Splendens* con 99% (Pardo *et al.*, 2010). Esta concentración es favorable para algunas especies de la familia Bromeliaceae que presentan cierta susceptibilidad a la salinidad bajo condiciones *in vitro*. Luttge (2004) menciona que las plantas epífitas-CAM son altamente sensibles a la salinidad, ya que, al absorber agua y nutrientes por las hojas, no están forzadas a desarrollar un mecanismo de tolerancia a la presencia de sales. Sin embargo, en la especie *Acanthostachys strobilacea* se presentó una mejor respuesta bajo la concentración de sales al 100% (Santos *et al.*, 2010).

La propagación *in vitro* de *T. macdougallii* y *T. violacea* es una alternativa de producción a gran escala. Sin embargo, es importante llevar a cabo otras metodologías de micropropagación que nos permitan establecer el protocolo de regeneración *in vitro* para estas dos especies.

Para que se pueda llevar a cabo el aprovechamiento sustentable de la especie *T. macdougallii* se recomienda que su cultivo sea en sustratos y de preferencia que se establezca en el lugar en donde crecen, por lo menos en el periodo de plántula que es el más vulnerable a diversos factores ambientales, además el cultivo convencional, presenta ventajas sobre el cultivo *in vitro* en cuanto a costos de producción. Sin embargo, el cultivo *in vitro* es una alternativa para especies con baja germinación o cuando las poblaciones son muy reducidas, como fue el caso de *T. violacea*.

## 7.1 Literatura citada

- Ansorena, M. J. 1994. Sustratos, Propiedades y Caracterización. Mundi Prensa, Madrid. 172p.
- Burés, S. 1997. Sustratos. Ediciones Agrotécnicas G. L. España, Madrid. pp. 182,189, 238, 243.
- Camacho, F. M. 2011. Dormición de semillas: causa y tratamientos. 2da edición. Ed. Trillas. México, D. F. 232p.
- Luttge, U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629-652.
- Marinho de Assis, A., R. Tadeu de Faria, L. A. Colombo e Jane & F. P. Rodrigues. 2005. Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). *Acta Scientiarum Agronomy Maringá*. 27(2): 255-260.
- Pardo, A., C. Michelangeli & N. Mogollón. 2007. Conservación *in vitro* de *Billbergia rosea* (Bromeliaceae). Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Del Zulia, Maracaibo, Venezuela. 41 (4): 517-529.
- Pardo, A., M. DaCosta, G. Alvarado & J. Lorbes. 2010. Conservación *in vitro* de *Vriesea splendens* var. *Splendens* (Bromeliaceae). Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Del Zulia, Maracaibo, Venezuela. 44(3): 317-330.
- Santos, D. S., Tamaki V. & Carvalho N. C. 2010. *In vitro* propagation of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult.f.) Klotzsch via nodal segments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 46:524-529.
- Sosa-Luría, D., Chávez-Servia J. L., Mondragón-Chaparro D., Estrada-Gómez y Ramírez-Vallejo P. 2012. Viabilidad y Germinación de seis especies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35(5):37-42.