

Efecto de las bajas temperaturas en la germinación in vitro de Bromelia (*Tillandsia bourgaei*)

RESUMEN: La familia de las Bromeliaceae se encuentran mayormente en el continente americano; en México, esta familia tiene gran presencia en los bosques mesófilos de montaña así como en los bosques de *Quercus*; Debido a que las bromelias poseen una gran importancia de índole económica para las distintas comunidades rurales y al ser consideradas por la autoridad como un recurso forestal no maderable susceptible de aprovechamiento, así como la tala del bosque mesófilo de montaña (BMM), se ha provocado una sobre explotación en esta especie.

El trabajo de investigación para evaluar el efecto de las bajas temperaturas en la germinación in vitro de Bromelia fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Zacatepec en el estado de Morelos, México.

El documento incluye todo el proceso llevado a cabo en el laboratorio, desde el establecimiento aséptico de la semilla, hasta la observación en microscopio del crecimiento de plántulas de la Bromelia (*Tillandsia bourgaei*).

Los resultados reflejaron que el almacenaje de las semillas a baja temperatura por 30 días, influye en la germinación, acelerando la aparición de primeras hojas y el desarrollo de las plántulas, no ocurriendo así en la formación de los callos.

PALABRAS CLAVE: Bromelia (*Tillandsia bourgaei*), cultivo in vitro, germinación, medio de cultivo MS, semillas.



Colaboración

Yesenia Keymi Mejía Santiago; Elizabeth Kenia Mejía Santiago; Fernando Isael Alvear Salazar; Carlos Arturo Loyola Torres, Universidad Tecnológica del Sur del Estado de Morelos

Fecha de recepción: 11 de febrero de 2020

Fecha de aceptación: 4 de mayo del 2021

ABSTRACT: The Bromeliaceae family is mainly found in the American continent. In México, this family has a great presence in tropical montane cloud forests as well as in *Quercus* forests. Due to bromeliads have a great economic importance for different rural communities and being considered by the authority as a non-timber forest resource susceptible to use, as well as the felling of the tropical montane cloud forest (TMCF), it has caused an over-exploitation in this species.

This investigation shows a scientific research carried out at the Plant Tissue Cultivation Laboratory at the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) in Zacatepec, Morelos, Mexico with the objective of evaluating the effect of low temperatures on in-vitro germination of bromeliad *Tillandsia bourgaei*.

This document includes the whole process carried out in the laboratory, from the aseptic establishment of the seed, to the microscopic observation of the growth of seedlings of bromeliad *Tillandsia bourgaei*.

The results showed that a storage of the seeds at a low temperature for 30 days, positively influences the germination, accelerates the appearance of the first leaves and development of the seedlings, thus not occurring in the formation of the callus.

KEYWORDS: in vitro culture, germination, MS culture medium, seeds.

INTRODUCCIÓN

La familia de las Bromeliaceae se encuentran mayormente en el continente americano; en nuestro país, esta familia tiene gran presencia en los bosques mesófilos de montaña así como en los bosques de *Quercus*; algunas especies tiene un gran valor

comercial y por lo tanto económico, entre las especies que tienen estas características se encuentran la piña (*Ananas sativus*), el timbiriche (*Bromelia spp*), la pita (*Aechmea magdalenae*) y el heno (*Tillandsia usneoides*) [1][4].

Debido a que las bromelias poseen una gran importancia de índole económica para las distintas comunidades rurales y al ser consideradas por la autoridad como un recurso forestal no maderable [2] susceptible de aprovechamiento, así como la tala del bosque mesófilo de montaña (BMM), se ha provocado una sobre explotación en esta especie [3], ya que algunas personas que se dedican a su venta para uso ornamental, utilizan métodos de propagación en donde implica extraer a las bromelias de su lugar de origen lo que ha provocado un descontrol biológico.

La especie de *Tillandsia bourgaei* requiere de una condición de humedad para poder germinar y en consecuencia sobrevivir, es por esto que se propaga en regiones con una altitud entre los 600 y los 3100 msn [2] [5] con lo que se convierte en una planta endémica. En Morelos existe la Cuenca Alta del Balsas que pertenece a un bosque mesófilo de montaña (BMM), en la cual se delimitaron cinco subregiones con base en las cuencas hidrográficas, así como la distancia entre los bosques [3], por lo que la especie de *Tillandsia bourgaei* tiene una fuerte presencia en los municipios de Cuernavaca, Puente de Ixtla, Tepoztlán y Tlayacapan, todos pertenecientes al estado de Morelos, desafortunadamente se ha catalogado como una especie en peligro de extinción (P), lo cual, según [6] es “aquella cuya área de distribución o tamaño de su población en el territorio nacional ha disminuido drásticamente poniendo en riesgo su viabilidad biológica en todo su hábitat natural, debido a factores tales como la destrucción o modificación drástica del hábitat, aprovechamiento no sustentable, enfermedades o depredación, entre otros”.

Dentro del catálogo de especies en riesgo publicado por [6], existen varias pertenecientes a la familia Bromeliaceae y el género *Tillandsia* que se encuentran bajo amenaza o incluso en peligro de extinción.

Para acelerar la propagación de esta planta sin alterar su ciclo biológico y sin afectar a la misma, se implementó un método de cultivo in vitro como lo sugiere [7], en el cual bajo factores controlados de laboratorio como son la temperatura, luz y medio de cultivo adecuado, se propuso como objetivo propagar esta especie hasta en un 94% de efectividad, medida a través de una tasa de germinación dando como resultado, un buen índice de hojas verdaderas y plántulas.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar las bajas temperaturas en la germinación in vitro de *Tillandsia bourgaei*.

Como objetivos específicos se establecieron los siguientes:

1. Determinar el índice de contaminación (por hongo y bacteria) en *Bromelia (Tillandsia bourgaei)*.
2. Evaluar el tiempo y porcentaje de germinación en la *Bromelia (Tillandsia bourgaei)*.

Es de vital importancia el trabajar con técnicas de propagación que sean sustentables con el proceso de vida de la bromelia, debido a su importancia ecológica, medicinal, ornamental, ecológica y social.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó como parte del periodo de estadía profesional en las instalaciones y bajo la colaboración del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en la comunidad de Zacatepec, Morelos, la cual se desarrollaron las etapas que se mencionan a continuación:

1. Selección de las semillas y almacenamiento.

Se seleccionaron las mejores semillas de *Bromelia (Tillandsia bourgaei)*, de forma manual, considerando la inflorescencia madura y abierta (Figuras 1 y 2), así mismo se tomó en cuenta, que las semillas estuvieran completas, llenas y sin pudrición o daños por insectos.

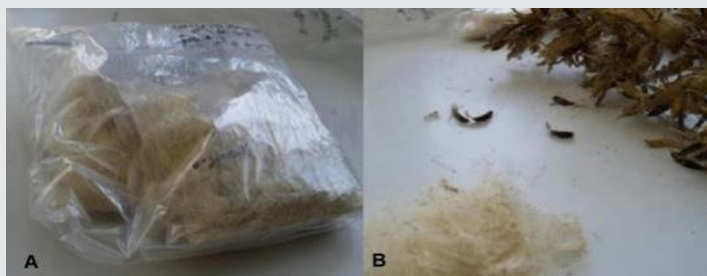


Figuras 1 y 2. Inflorescencia madura de *Tillandsia bourgaei* (izq.) y semillas recién cosechadas (der.)

Se separaron las semillas de su vilano plumoso para evitar la presencia de agentes que favorecieran la contaminación durante la germinación [8]. Todas las semillas cosechadas se separaron en dos grupos de 150 utilizando costales de tela.

A fin de poder cumplir con los objetivos de la investigación, se consideró el almacenamiento de la semilla de bromelia para evaluación de germinación bajo dos temperaturas, la primera a 25°C (temperatura normal-promedio en el municipio de Zacatepec), y la segunda a 2°C (temperatura baja). Para la realización de este almacenamiento, se tomó como base lo establecido por [9].

El almacenamiento se llevó a cabo dentro de bolsas de plástico, con cierre tipo ziploc, para una mejor manipulación en el experimento (Figuras 3 y 4).



Figuras 3 y 4. Selección de semillas y almacenamiento de semilla

2.Preparación del medio de cultivo a mitad de sales (MS).

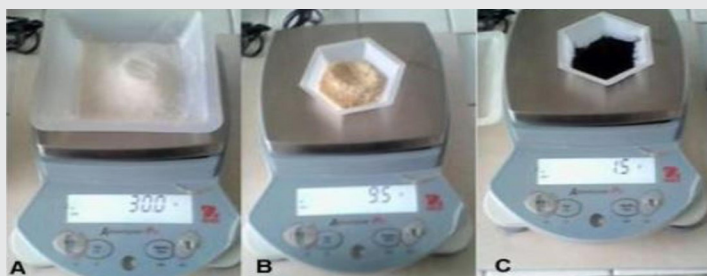
El medio de cultivo es parte vital para la propagación de cultivos in vitro; para el estudio se preparó el medio a mitad de sales (MS), de acuerdo al estudio probado y validado por el INIFAP.

Para proporcionar el mínimo de nutrientes requeridos en la germinación in vitro de la bromelia, se preparó un litro de medio de cultivo Murashige y Skoog a mitad de sales, considerando los componentes que se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Preparación medio de cultivo (MS)

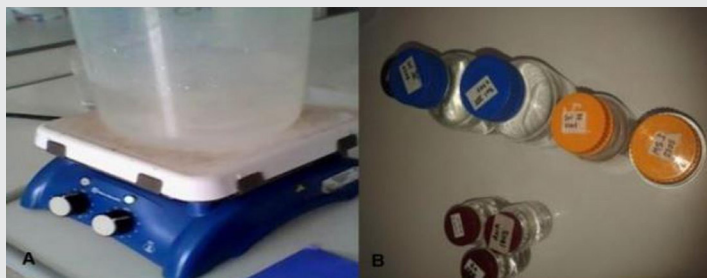
Soluciones de Murashige y Skoog a mitad de sales	Concentración
Coctel II	10 mL/L
Sacarosa	30 g/L
BA	10 mL/L
ANA	1 mL/L
Carbón activado	1.5 g/L
Agar Merck	9.5 g/L
pH	5.7

Para un litro de medio de cultivo se pesaron 30 g de sacarosa, 9.5 g del polisacárido agar y 1.5 g de carbón activado (Figuras 5, 6 y 7).



Figuras 5,6 y 7. Uso de balanzas analíticas para preparación de medios de cultivo.

En un agitador magnético (Figuras 8 y 9) se colocó un recipiente de 1000 mL con 200 mL de agua estéril para la disolución de la sacarosa, las soluciones madre, y el carbón activado.



Figuras 8 y 9. Agitador magnético y Soluciones madre I-V, BA, ANA y Coctel II.

Se aforó a un litro con agua desionizada en una probeta de 2000 mL (Figura 10); con el apoyo de un potenciómetro (Figura 11) se ajustó a un pH de 5.7, agregando para ello soluciones de NaOH a 1,0 N y HCl a 1,0 N.



Figuras 10 y 11. Probeta de 2000 mL y potenciómetro

Para la preparación del medio (MS) se utilizó un matraz Erlenmeyer de dos litros, se agregaron 7.5 g/L de Agar Merck®. Se calentó a 70 °C, y una vez logrado el punto de ebullición, se retiró de la estufa con equipo de seguridad (Figura 12 a), después se sirvió en 33 frascos de vidrio esterilizados y secos (Figura 12 b) con ayuda de una probeta y una jarra, el volumen agregado a cada frasco fue de 10 mL (Figura 12 c).



Figura 12. (a) Medio de cultivo en punto de ebullición (b) frascos para cultivos (c) 10 mL medio de cultivo en probeta

Los frascos con el medio de cultivo a mitad de sales (MS) fueron esterilizados en autoclave, a una temperatura de 121°C, a presión de 23 psi, durante 20 minutos (Figura 13).



Figura 13. Autoclave

3. Desinfección y siembra de las semillas de bromelia (*Tillandsia bourgaei*).

4. Semilla conservada a temperatura ambiente.

La primera evaluación consistió en hacer germinar las semillas de bromelia almacenadas a temperatura ambiente.

El primer paso fue la desinfección de las semillas, actividad que se detalla a continuación:

1.- Se procedió a sumergir las semillas por un minuto en un frasco de vidrio de 100 mL que contenía etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) [10] al 70%, esto se realizó en el interior de una campana de flujo laminar (Figura 14-A) y se realizó un enjuague por cinco veces con agua desionizada y esterilizada. Posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 30% + detergente Tween (polisorbato 20) (14 gotas por 100 ml) por 20 min (Figura 14-B). Se volvió a enjuagar cinco veces con agua desionizada y esterilizada (Figura 14-C). Por último se protegieron las semillas con solución del fungicida captan N-triclorometilitio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida (8g/L) + fertilizante NP Agrimins (8g/L) + un coadyuvante Poliéter polimetilsiloxano copolímero Break-Thru (10 gotas por 100mL) durante 15 min (Figura 14-D).



Figuras 14. (a) Etanol al 70% de agua, (b) NaClO al 30%, (c) agua estéril y (d) solución de captan, agrimin y Break-Thru

2.- Las semillas remojadas se tomaron con las pinzas de disección y se sembraron directamente en una caja Petri misma que tenía el medio de cultivo MS (Figura 15).

3.- Se colocaron 10 semillas de la bromelia en cada uno de los 15 frascos, con un total de 150 semillas. Los frascos se etiquetaron y fueron colocados en el cuarto de incubación a una temperatura media de 25°C y con luz led (una lámpara diodo emisor de luz) de 60 watts.



Figura 15. Caja Petri con semillas.

5. Ensayo con semillas almacenadas a temperatura de 2°C .

Después de permanecer 30 días almacenadas en una cámara de enfriamiento a 2°C , las semillas de bromelia se retiraron de la cámara de refrigeración y se inició el mismo procedimiento que el descrito para aquellas que se almacenaron a temperatura ambiente.

Se sembraron 10 semillas en 15 frascos, con un total de 150 semillas. Mismos que se etiquetaron con el nombre de la especie y fecha de siembra y fueron puestos en el cuarto de incubación a una temperatura media de 24°C y con luz de 60 watts.

6. Supervisión de los dos tratamientos

Porcentaje de contaminación

Después de la siembra de las semillas en el medio de cultivo, los frascos se revisaron diariamente para contabilizar y eliminar los que presentaban contaminación. Se efectuaron los registros de días de contaminación, tipo de contaminación (hongo y/o bacteria), y número de frascos contaminados por tratamiento (% de contaminación).

Porcentaje de germinación.

Diariamente se observaron las semillas para registrar el hinchamiento las mismas, así como cambio de color y número de semillas germinadas. Posteriormente, se midió el tamaño de la plántula cada siete días con un total de cuatro observaciones.

RESULTADOS

1 Índice de contaminación por hongos y bacterias conservada a temperatura ambiente.

A partir del segundo día de colocación de las semillas, se comenzó a medir el número de frascos que presentaban contaminación por hongos y/o bacterias en los frascos de Bromelia (*Tillandsia bourgaei*), así también se registró el índice de contaminación; los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Tabla en la que se muestra el porcentaje de contaminación del tratamiento con semilla almacenada a temperatura ambiente por Hongos y bacterias.

No. de frascos	No. de frascos contaminados	% frascos contaminados
1	0	0%
2	0	0%
3	0	0%
4	0	0%
5	0	0%
6	0	0%
7	0	0%
8	0	0%
9	0	0%
10	0	0%
11	0	0%
12	0	0%
13	0	0%
14	0	0%
15	0	0%
Totales	0	0%

Como se puede apreciar, no se presentó contaminación por hongos y/o bacterias, esto es atribuible al correcto procedimiento de desinfección de la semilla y al manejo de todo el proceso de siembra al que se sometió.

2 Germinación in vitro de semillas de Bromelia (*Tillandsia bourgaei*) conservadas a temperatura ambiente.

Desde el día cero se contabilizó el porcentaje de germinación (Figura 16 a), así como la aparición de las primeras hojas (Figura 16 b) y callos (Figura 16 c).

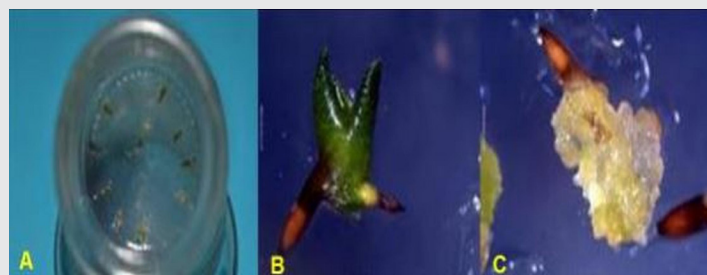
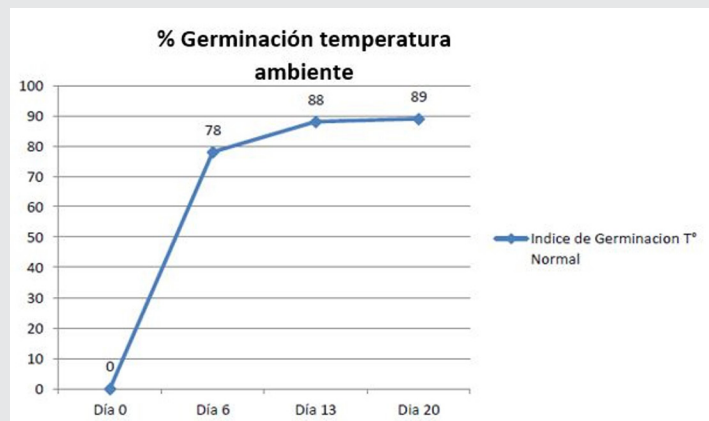


Figura 16. (a) Inicio de la germinación, (b) inicio de las primeras hojas y (c) formación de callos.

En la gráfica 1, se muestran los resultados del índice de germinación a temperatura ambiente. A los 6 días comenzó la germinación, es decir, obteniendo 117 semillas germinadas con un porcentaje del 78%.

También se pudo observar que la semilla se encontraba en la etapa cuatro, donde la germinación era visible y el embrión era verde claro, ya en esta etapa se podía observar el hipocótilo, para los 13 días se incrementó la germinación a un 88%; para los 20 días la germinación final fue de un 89%.

Hay que señalar que del 89% de germinación, un 28.66% fue de plántulas y 60.66% de callos.



Gráfica 1: Porcentaje de germinación de Bromelia (*Tillandsia bourgaei*)

3 Aparición de primeras hojas y callos y tasa de crecimiento en semillas conservadas a temperatura ambiente.

A partir de los 27 días se comenzó a apreciar las primeras hojas. (Figura 17 a), teniendo como resultados un 60.66% de callos y un 28.66% de plántulas. A los 34 días se obtuvo un porcentaje de 28.66% de plántulas con un tamaño medio de tres milímetros y un 60.66% de callos (Figura 17 b).

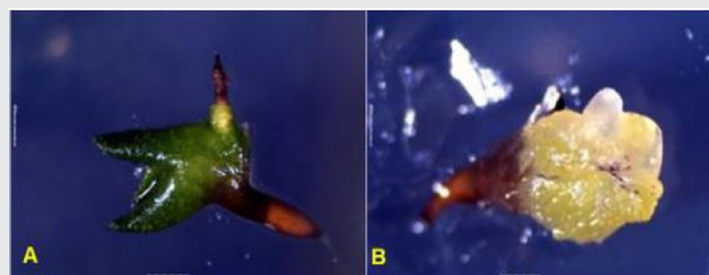


Figura 17. (a) Primeras hojas y (b) callos en Bromelia (*Tillandsia bourgaei*)

4 Índice de contaminación por hongos y bacterias, en semillas de la bromelia conservadas 2 °C por 30 días.

El índice de contaminación por hongos y/o bacterias (Tabla 3) en los frascos de Bromelia (*Tillandsia bour-*

gaei) fue cero, lo que demostró la calidad del procedimiento ejecutado en el transcurso del experimento.

Tabla 3: Tabla en la que se muestra el índice de contaminación de semilla almacenadas a baja temperatura por Hongos y/o Bacterias

No. de frascos	No. de frascos contaminados	% frascos contaminados
1	0	0%
2	0	0%
3	0	0%
4	0	0%
5	0	0%
6	0	0%
7	0	0%
8	0	0%
9	0	0%
10	0	0%
11	0	0%
12	0	0%
13	0	0%
14	0	0%
15	0	0%
Totales	0	0%

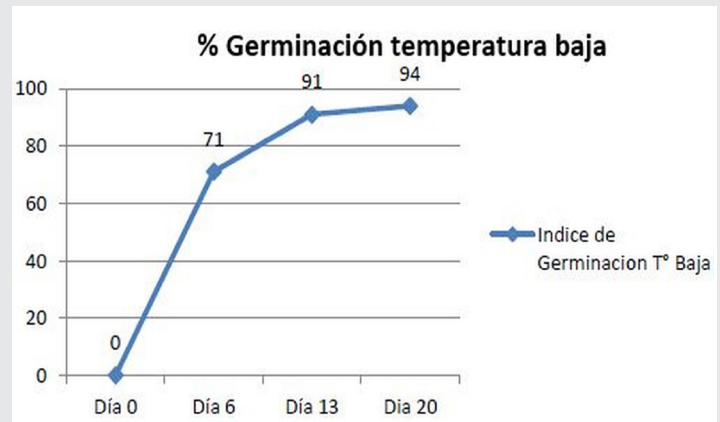
5 Germinación in vitro de bromelia (Tillandsia bourgaei) de semillas conservadas 2°C por 30 días.

Se contabilizó el índice de germinación de las semillas almacenadas a 2°C. La germinación inició a partir del sexto día, donde se pudo observar como el embrión se fue abultando hasta que uno de los extremos del eje embrionario rompió las envueltas seminales y se apreció, dando la primera señal palpable de que la semilla estaba germinando (Figura 18).



Figura 18. Inicio de germinación en bromelia in vitro.

En la gráfica 2 se aprecia el índice de germinación a los seis días fue del 71%, donde se pudo observar el hipocófito, a los 13 días se incrementó la germinación a un 91%, posteriormente a los 20 días la germinación máxima alcanzó un 94%.



Gráfica 2. Porcentaje de germinación de bromelia (Tillandsia bourgaei) a baja temperatura 2°C

6 Aparición de primeras hojas y callos en bromelia (Tillandsia bourgaei) y tasa de crecimiento, de semillas conservadas 2°C por 30 días.

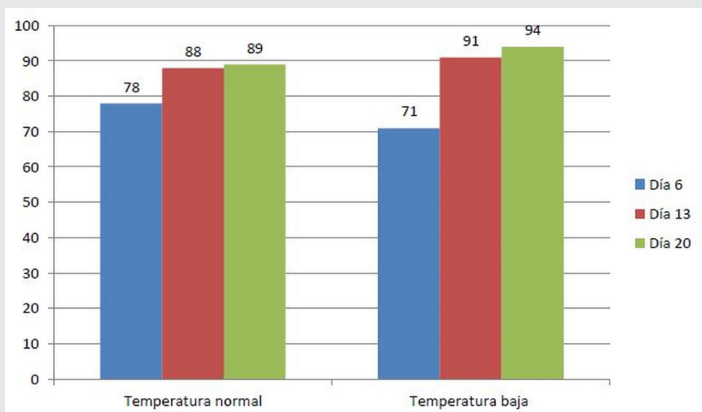
La aparición de las primeras hojas (Figura 19) se observó a los 20 días de la fecha cero y la tasa de crecimiento a partir del mismo día. Al cumplir 27 días había alcanzado un 40.66% en callos y un 53.3% en plántulas. La última medición que se realizó fue a los 34 días, donde se alcanzó un 41.33% en callos y un 55.33% en plántula, teniendo un constante avance en el crecimiento con tres milímetros aproximadamente en altura de las plántulas.



Figura 19. Aparición de primeras hojas y callos en bromelia, conservada a 2°C

7 Comparación de la germinación en ambos tratamientos.

La gráfica 3 muestra que cuando las semillas se almacenaron a temperatura ambiente el porcentaje final de germinación no rebasa el 89%, pero cuando las semillas se conservan 2°C por 30 días alcanzan un 94%. Lo que marca una diferencia de 5% en la germinación en bromelia (Tillandsia bourgaei), y que permite concluir que existió un proceso de escarificación cuando se baja la temperatura, y promueve la germinación.



Gráfica 3. Porcentajes de germinación en ambos tratamientos.

8 Comparación de la aparición de las primeras hojas y tasa de crecimiento en ambos tratamientos.

Las primeras hojas son importantes ya que pueden garantizar un buen sistema radicular y con esto, contribuir a tener una planta sana y vigorosa; en los tratamientos se observaron las primeras hojas en distintos días, ya que el tratamiento uno tuvo su aparición de primeras hojas a los 27 días de la fecha cero y registró un 60.66% de callos y un 28.66% de plántulas sanas teniendo en cuenta que la germinación total era de 89% y con un tamaño en promedio a tres milímetros.

En el tratamiento dos de baja temperatura, se pudo observar que las primeras hojas aparecieron a partir del día 20, es decir, siete días antes que el tratamiento uno. Lo cual reflejó que un almacenaje a temperatura baja contribuye a la germinación y acelera la aparición de primeras hojas.

Ambos tratamientos no presentaron ningún tipo de contaminación por hongos y/o bacterias, lo que indica que esta especie tiene una buena relación con el medio utilizado.

La tasa de crecimiento del tratamiento dos, referida a callos fue de 41.33%, mientras que el tratamiento uno lo superó con un 60.66% en callo. Con respecto al desarrollo de las plántulas los resultados reflejaron que el tratamiento dos superó con un 55.33% al tratamiento uno que solo obtuvo un 28.66%.

CONCLUSIONES

Considerando los datos obtenidos en este estudio se pueden considerar datos cuantitativos en función de hasta un 5% de diferencia en la germinación de las semillas sometidas a bajas temperaturas

Los resultados en el proyecto muestran que la temperatura de almacenaje influye en la germinación in vitro. Asimismo, el almacenaje de las semillas a temperatu-

ra baja hasta por 30 días, influye positivamente en la germinación, acelera la aparición de primeras hojas y desarrollo de las plántulas, no ocurriendo así en la formación de los callos.

Es importante destacar que el procedimiento utilizado en el transcurso del proyecto, para el cultivo in vitro de la bromelia garantizó que no existiera contaminación de hongos y bacterias. Con estas contribuciones se pudo tener un ahorro significativo para los investigadores que trabajan con esta y otras especies, ya que a menor contaminación mayor número de plantas obtenidas para su futura aclimatación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias del municipio de Zcatepec de Hidalgo en el estado de Morelos, por todas las facilidades en la estadía de investigación, y cuyo acuerdo de colaboración fueron esenciales en la culminación de nuestro proceso formativo como Técnicos Superiores Universitarios en Agricultura Sustentable y Protegida.

Gracias a la Universidad Tecnológica del Sur del Estado de Morelos (UTSEM) que ha sido de mucho apoyo en nuestra formación como futuros ingenieros.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Espejo Serna Adolfo, López Ferrari Ana Rosa. (2018). *La familia Bromeliaceae en México*. *Botanical Sciences* (pp. 533 - 554).
- [2] Carvente Acteopan Sabina et al. (2017). *Diversidad y abundancia de bromelias epifitas en "El Punto" Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca* *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Pub. Esp. No. 18* (pp. 3661-3671).
- [3] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2010). *El Bosque Mesófilo de Montaña en México*.
- [4] Mondragon Chaparro, D. M., Ramirez Morillo, I. M., Flores Cruz, M., & Garcia Franco, J. G. (2011). *La Familia Bromeliaceae en Mexico*. *Universidad Autónoma Chapingo*.
- [5] Lopez, S., Ramirez, M., Holst, B., Luther, H., & Till, W. (2004). *Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism*. *Selbyana*.
- [6] SEMARNAT. (30 de Diciembre de 2010). *Profepa. Recuperado el 13 de 03 de 2017, de NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf*

[7] Krikorian, A.D. (1991) *Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación*. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (pp. 41 - 77). Cali, CO.

[8] Eleodoro Hernández-Meneses, et al (2018). *Germinación, Viabilidad y Regeneración In Vitro de plantas de Vriesea heliconioides (Kunth) Hook. ex Wal.* Revista Fitotecnia Mexicana, vol. 41, núm. 2 (pp. 99 - 113)

[9] Vadillo, G., Suni, M., & Cano, A. (09 de Julio de 2004). ISSN 1727. Recuperado el 28 de Junio de 2016, de *Viabilidad y Germinacion de Semillas Puya raimondii Harms (Bromeliaceae)*: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v11n1/v11n1a09.pdf>

[10] Nunes Vaz Pedroso, A., Morais Lazarini, R. A., & Calvalho Nievola, C. (2010). *In vitro culture at low temperature and ex in vitro acclimatization of Vriesea inflata an ornamental bromeliad*. Revista Brasil, 407-414.