

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA, TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN Y DEL ÁCIDO
GIBERÉLICO, EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Tillandsia xerographica***

Rohw

ANGELA NOEMI MEOÑO CANEL

GUATEMALA, JULIO DE 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA, TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN Y DEL
ÁCIDO GIBERÉLICO, EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Tillandsia
xerographica Rohw***

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

ANGELA NOEMI MEOÑO CANEL

En el acto de investidura como

INGENIERA AGRÓNOMA

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADA

GUATEMALA, JULIO DE 2013

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

RECTOR MAGNÍFICO

Dr. Carlos Estuardo Gálvez Barrios

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

| | | |
|---------------|----------------|------------------------------------|
| DECANO | Dr. | Lauriano Figueroa Quiñonez |
| VOCAL PRIMERO | Dr. | Ariel Abderramán Ortiz López |
| VOCAL SEGUNDO | Ing. Agr. Msc. | Marino Barrientos García |
| VOCAL TERCERO | Ing. Agr. Msc. | Oscar René Leiva Ruano |
| VOCAL CUARTO | Br. | Ana Isabel Fión Ruiz |
| VOCAL QUINTO | Br. | Luis Roberto Orellana López |
| SECRETARIO | Ing. Agr. | Carlos Roberto Echeverría Escobedo |

Guatemala, julio de 2013

Honorable Junta Directiva
Honorable Comité Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración el trabajo de tesis:

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA, TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN
Y DEL ÁCIDO GIBERELICO, EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS
DE *Tillandsia xerographica* Rohw**

Como requisito previo a optar el Título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente,
“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Angela Noemi Meoño Canel

ACTO QUE DEDICO

A:

| | |
|--------------|--|
| DIOS | Por darme el aliento de vida y ayudarme alcanzar esta meta. |
| MI PADRE | Francisco Javier Meoño Cabrera Por su amor incondicional y ser mi primer maestro en la escuela de la vida. |
| MI MADRE | Marta Julia Canel de Meoño Por su amor incondicional y servicio. |
| MIS HERMANOS | Andrea Carolina Meoño Canel Por su amor y ser una buena amiga. Cristian Francisco Meoño Canel Por su amor y alegría. Y recordarme lo único que es ser un niño. |
| MI ESPOSO | Ing. Agr. César Augusto Mazariegos Herrera Por su amor y amistad. Pero sobre todo por su apoyo en esta investigación. |
| MI ABUELA | Luisa de León |
| MI TÍA | Carmen de León Por ser mi segunda madre |
| MIS AMIGOS | Eunice Caravantes, Fabiola Zepeda, Linda Leal, Mónica Jiménez, Paola Villacinda, Sofía Ibáñez, Gabriela Calderón, Enrique Maldonado, Dennis Reyes, Henry Tzarax, Nancy Castro. |

AGRADECIMIENTO

A:

Mi asesor:

Ing. Agr. Edgar Oswaldo Franco Rivera

Los Ingenieros Agrónomos:

Sabrina Posadas

Julio Berdúo

Señorita:

Angela Badalamenti de Ornamentales B&G

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. PLANTEAMIENTO PROBLEMA | 2 |
| 3. JUSTIFICACIÓN DE INVESTIGACIÓN..... | 3 |
| 4. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| 4.1 Marco conceptual..... | 4 |
| 4.1.1 Género <i>Tillandsia</i> | 4 |
| 4.1.2 Descripción <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> | 7 |
| 4.1.3 Propagación de <i>Tillandsia</i> in vitro..... | 12 |
| 4.1.4 Aspectos generales que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> | 12 |
| 4.2 Marco referencial | 18 |
| 4.2.1 Localización del experimento | 18 |
| 5. OBJETIVOS..... | 19 |
| 5.1 General..... | 19 |
| 5.2 Específicos..... | 19 |
| 6. HIPÓTESIS..... | 20 |
| 7. MATERIALES Y EQUIPO | 21 |
| 7.1 Equipo..... | 21 |
| 7.2 Materiales | 21 |
| 8. METODOLOGÍA | 22 |
| 8.1 Obtención semillas..... | 22 |
| 8.2 Experimentos para incrementar la germinación de <i>T. xerographica Rohw</i> | 23 |
| 8.3 Procedimientos Generales | 23 |
| 8.3.1 Medio de cultivo | 23 |
| 8.3.2 Preparación de los medios de cultivo para la inducción de germinación | 24 |
| 8.3.3 Procedimientos asépticos | 25 |

| | | |
|-------|---|----|
| 8.3.4 | Desinfección de cápsulas o semillas | 25 |
| 8.3.5 | Siembra de semillas | 25 |
| 8.4 | Procedimientos implementados en cada experimento..... | 26 |
| 8.4.1 | Experimento 1: Evaluación del efecto de la temperatura de incubación (25°C y 30°C) en la germinación de semillas de <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> en medio basal MS solido al 50% de componentes inorgánicos..... | 26 |
| 8.4.2 | Experimento 2: Evaluación del efecto de cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semillas de <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> en medio basal MS semisólido al 100% de componentes inorgánicos..... | 27 |
| 8.4.3 | Experimento 3: Evaluación de cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG3) en la germinación de semillas de <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> aplicado al medio basal MS solido con 120% de componentes inorgánicos..... | 32 |
| 8.5 | Diseño experimental..... | 34 |
| 8.6 | Unidad experimental | 34 |
| 8.7 | Variable de respuesta | 34 |
| 9. | RESULTADOS..... | 35 |
| 9.1 | Experimento 1: Evaluación del efecto de la temperatura de incubación (25°C y 30°C) en la germinación de semillas de <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> en medio basal MS solido al 50% de componentes inorgánicos | 35 |
| 9.1.1 | Tratamiento 1: incubación de 25°C | 35 |
| 9.1.2 | Tratamiento 2: incubación de 30°C | 35 |
| 9.2 | Experimento 2: Evaluación del efecto de cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semillas de <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> en medio basal MS semisólido al 100% de componentes inorgánicos | 36 |
| 9.3 | Experimento 3: Evaluación de cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG3) en la germinación de semillas de <i>Tillandsia xerographica Rohw</i> aplicado al medio basal MS solido con 120% de componentes inorgánicos..... | 39 |
| 10. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 41 |
| 11. | CONCLUSIONES..... | 43 |
| 12. | RECOMENDACIONES..... | 44 |
| 13. | BIBLIOGRAFÍA..... | 45 |
| 14. | Anexos | 47 |
| | Anexo 1. Componentes del medio MS | 47 |
| | Anexo 2. Preparación Soluciones Concentradas..... | 48 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1 Tratamiento de escarificación aplicada a las semillas de <i>T. xerographica</i> Rohw..... | 27 |
| Cuadro 2 Tratamientos concentraciones AG3 | 32 |
| Cuadro 4 Componentes macronutrientes A medio MS | 48 |
| Cuadro 5 Componentes macronutrientes B medio MS | 48 |
| Cuadro 6 Componentes micronutrientes A medio MS | 49 |
| Cuadro 7 Componentes micronutrientes B medio MS | 49 |
| Cuadro 8 Componentes micronutrientes C medio MS | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Anatomía de la semilla del género <i>Tillandsia</i> | 5 |
| Figura 2 <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw..... | 8 |
| Figura 3 Cápsulas abiertas de semilla <i>T. xerographica</i> Rohw. | 22 |
| Figura 4 Cápsulas cerradas de semilla <i>T. xerographica</i> Rohw. | 22 |
| Figura 5 Semilla <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw corte distal | 28 |
| Figura 7 Lavado de semilla <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw con agua en forma continua por 24 horas .. | 29 |
| Figura 6 Semilla <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw sumergidas en ácido sulfúrico 40% | 29 |
| Figura 8 Semilla <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw sumergidas en AG3 | 30 |
| Figura 9 Semilla <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw con corte distal sumergidas en AG3 | 31 |
| Figura 10 Experimento 3. Unidades experimentales. | 33 |
| Figura 11 Experimento 1. Unidades experimentales | 35 |
| Figura 12 Experimento 2. Número semillas germinadas..... | 36 |
| Figura 13 Porcentajes de semillas germinadas en el tratamiento inmersión de semillas por 24 horas en una solución de ácido giberélico a 10mg/l más corte distal..... | 37 |
| Figura 14 Semillas germinadas <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw | 37 |
| Figura 15 Semillas germinadas <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw | 38 |
| Figura 16 Experimento 2. Unidades experimentales | 38 |
| Figura 17 Experimento 3. Porcentaje Germinación de semilla <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw | 39 |
| Figura 18 Semillas de <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw en medio cultivo | 40 |
| Figura 19 Semilla germinada de <i>Tillandsia xerographica</i> Rohw..... | 40 |

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, TRATAMIENTOS DE ESCARIFICACIÓN Y DEL ÁCIDO GIBERÉLICO, EN LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Tillandsia xerographica Rohw*

EFFECT OF TEMPERATURE, SCARIFICATION TREATMENT AND GIBBERELIC ACID, ON SEED GERMINATION OF *Tillandsia xerographica Rohw*

RESUMEN

Guatemala exporta anualmente especímenes de flora silvestre al extranjero con fines ornamentales. Entre las especies demandadas se encuentran los gallitos o plantas del aire, las cuales pertenecen a la familia *Bromeliaceae*. Entre las especies de tillandsias se encuentra *Tillandsia xerographica Rohw*, la cual es una especie epífita que se encuentra distribuida en la zona del sur de México, en Guatemala y El Salvador, y su hábitat natural es semiárido. Según el Consejo Nacional de Áreas protegidas (CONAP) dicha especie se encuentra reportada en la “lista roja de especies de flora”, esta categoría incluye las especies que se encuentran en peligro de extinción.

Una limitante para la propagación de la especie de *Tillandsia xerographica Rohw* es la baja germinación de su semilla, la cual presenta dormancia, los métodos de propagación de *T. xerographica Rohw* en la naturaleza son lentos y se vuelven difíciles de realizar por encontrarse pocos individuos en su hábitat natural, ya que para el éxito de la fecundación el óvulo de *T. xerographica Rohw* requiere de la polinización cruzada que es iniciada cuando la planta tiene alrededor de 12 años. La germinación in vitro surge como una posibilidad para la propagación rápida, así evitar la extracción y extinción en el hábitat natural de la especie *T. xerographica Rohw*.

El objetivo principal de la investigación fue contribuir al desarrollo de una metodología que permitan la propagación de *Tillandsia xerographica Rohw*, especie que se encuentra en peligro de extinción

En la investigación se realizaron tres experimentos en la germinación de las semillas de *T. xerographica Rohw*. En el primer experimento se evaluaron dos tratamientos en los cuales el factor variante fue la temperatura entre 25°C y 30°C, en un medio basal MS sólido al 50% de componentes inorgánicos. En el experimento dos se evaluaron tratamientos de escarificación de semilla siendo estos: corte distal de la semilla, inmersión de semillas en ácido sulfúrico al 40% de concentración por cuatro horas, lavado en agua continua por 24 horas, inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico e inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico mas corte distal, finalmente en el experimento tres se evaluaron cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG₃) aplicado al medio de germinación MS sólido con 120% de componentes inorgánicos

Como resultado de los tres experimentos realizados en esta investigación se tiene los resultados siguientes: las semillas de *Tillandsia xerographica Rohw* incubadas a 30 °C se deshidratan, mientras que incubadas a 25 °C no se deshidratan. De los tratamientos de escarificación el único que incrementó la germinación de esta especie fue el tratamiento de corte distal de la semilla de *Tillandsia xerographica Rohw* seguido de inmersión por 24 horas en una solución de ácido giberélico. El ácido giberélico aplicado al medio de germinación tiene efecto en la germinación de la semilla de *Tillandsia xerographica Rohw* a mayor concentración de ácido giberélico aplicado al medio, en un rango de 0.1 a 1.5 mg/l ácido giberélico, se obtuvo un mayor número de semillas germinadas.

1. INTRODUCCIÓN

Guatemala exporta anualmente especímenes de flora silvestre al extranjero con fines ornamentales. Entre el 2011 – 2012 las ventas de éstas fueron de alrededor de los US\$30.0 millones (BANGUAT, 2012), exportando a diferentes países principalmente Holanda, Estados Unidos y Alemania (AGEXPORT, 2012).

Entre las especies demandadas se encuentran los gallitos o plantas del aire (*Tillandsia* spp.). Las cuales pertenecen a la familia *Bromeliaceae*. Entre las especies de tillandsias se encuentra *Tillandsia xerographica* Rohw la cual es una especie epífita que se distribuye en toda la zona del sur de México, en Guatemala y El Salvador, y su hábitat natural es semiárido. En estas zonas áridas las noches frías hacen que las plantas amanezcan cubiertas de rocío por las mañanas. El resto del día, las plantas soportan un clima extremadamente seco. Su follaje gris permite a la planta reflejar la radiación.

El uso principal de las tillandsias es ornamental. La mayoría de empresas continúan colectándolas de su hábitat natural para utilizarlas como pié de cría. Otro factor que también amenaza y reduce las poblaciones naturales vulnerables en el país es la destrucción del hábitat de estas especies. Tal es el caso de especie *Tillandsia xerographica* Rohw, la cual actualmente se encuentran incluidas en los listados de especies en peligro de extinción (CONAP, 2006).

El objetivo principal de la investigación fue contribuir al desarrollo de una metodología que permitan la propagación de *Tillandsia xerographica* Rohw, especie que se encuentra en peligro de extinción. La investigación consistió en evaluar diferentes tratamientos para obtener la germinación in vitro de las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw. Se evaluó el efecto de la temperatura, tratamientos de escarificación y el ácido giberélico en la germinación de la semilla.

2. PLANTEAMIENTO PROBLEMA

La situación geográfica de Guatemala y su diversidad climática son factores que propician la formación de diversos ecosistemas en los que existe una alta diversidad de especies en su flora. No obstante muchas especies corren el peligro de desaparecer en la medida que son objeto del tráfico ilegal o que su hábitat son reducidos o destruidos.

Existen alrededor de 500 especies de tillandsias descritas. De éstas aproximadamente 65 se encuentran en Guatemala. Entre ellas se encuentra la especie *Tillandsia xerographica Rohw* que desde hace poco se creía que su comercio era controlado y sostenible, sin embargo es amenazada por la extracción selectiva para su uso como ornamento y por el cambio de uso del suelo, lo cual destruye su hábitat.

Según el Consejo Nacional de Áreas protegidas (CONAP) dicha especie se encuentra reportada en la “lista roja de especies de flora”, esta categoría incluye las especies que se encuentran en peligro de extinción. Las especies en esta categoría pueden ser utilizadas exclusivamente con fines científicos y reproductivos. Se prohíbe la libre exportación y comercialización de estas especies extraídas de la naturaleza. Pueden comercializarse aquellos especímenes, partes y derivados que se han reproducido por métodos comprobados.

La especie de *Tillandsia xerographica Rohw* a causa de su depredación y destrucción de su hábitat se encuentra como una especie en peligro de extinción. Entre 1993 y 1995, Guatemala exporto 14.5 millones de plantas de tillandsias anualmente, se estima que por lo menos el 75% de estas plantas fueron colectadas en su estado silvestre (según Plan para la Cosecha Sustentable de Bromelias realizado por Universidad Autónoma de Chiapas 2007), Una limitante para la propagación de la especie de *Tillandsia xerographica Rohw* es la baja germinación de su semilla, la cual presenta dormancia.

3. JUSTIFICACIÓN DE INVESTIGACIÓN

Existe una tendencia al incremento de la demanda internacional de especies ornamentales, las tillandsias (gallitos), son demandadas en el mercado internacional, según la Asociación Guatemalteca de Exportadores (AGEXPORT, 2010 listado de especies exportadas). Aunque las tillandsias existen originalmente en la naturaleza y se extraen de ésta, es importante desarrollar investigaciones con el objetivo de explorar métodos de propagación masiva, para su comercio y conservación.

Los métodos de propagación de *Tillandsia xerographica Rohw* en la naturaleza son lentos y se vuelven difíciles de realizar por encontrarse pocos individuos en su hábitat natural. Según García Ordoñez la tasa de germinación de la semilla de *T. xerographica Rohw* en la naturaleza es desconocida, aunque se estima ser muy baja debido al largo ciclo de reproducción y la pérdida de la especie. Es necesario realizar investigación para conocer los factores que incrementan la germinación.

La germinación in vitro surge como una posibilidad para la rápida propagación, así evitar la extracción y extinción en el hábitat natural de la especie *Tillandsia xerographica Rohw*. Es importante conocer los factores que inciden en la germinación de la semilla de esta especie, y posteriormente incrementar su porcentaje de germinación para así obtener material vegetal para inducir brotes adventicios.

La información obtenida en la presente investigación contribuye en el desarrollo de metodologías para la propagación de la especie de *Tillandsia xerographica Rohw* in vitro.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Marco conceptual

4.1.1 Género *Tillandsia*

Las plantas del género *Tillandsia* son epífitas, en ocasiones terrestres o rupícolas, caulescentes acaules. Hojas arrosetadas o fasciculadas, raramente distribuidas uniformemente a lo largo del tallo, enteras. Inflorescencia simple o compuesta. Flores bisexuales; sépalos asimétricos, estambres libres o junto a los pétalos; ovario súpero. Fruto en cápsula; semillas con apéndices plumosos (Castañeda, 2003).

4.1.1.1 Características de las semillas del género *Tillandsia*

El desarrollo de las semillas en el género *Tillandsia*, es un óvulo que se convierte en una semilla al momento que el polen llega al estigma, luego el tubo polínico penetra el estigma, pasa por el estilo y llega al ovario, en donde se realiza la fertilización del óvulo. En bromelias, este producto de la fusión se divide para producir un endospermo de textura suave, que ocupa gran parte el interior de la semilla y contiene la mayor parte de los carbohidratos de reserva, proteínas, vitaminas y minerales. El embrión crece lentamente, alimentado por el endospermo, que es descompuesto por las enzimas segregadas por los cotiledones (hojas de semillas) del embrión. (Benzing, 1980).

Una semilla de bromelia madura es un órgano que consta de la testa, con sus apéndices de origen materno. El embrión ocupa sólo una porción pequeña de la semilla, por lo general no más de un tercio del volumen total. Se coloca en el extremo opuesto al punto de unión a la pared del ovario (Benzing, 1980).

En la madurez un embrión de bromelias se compone de un cotiledón carnoso, situado al abrigo del endospermo, un ápice embrionario pequeño con varias hojas parcialmente desarrolladas y una raíz primaria parcialmente desarrollada (Benzing, 1980).

Cada especie de *tillandsia* produce desde algunas docenas hasta miles de semillas en la temporada reproductiva. Cada flor polinizada produce una cápsula con tres cámaras. El número de cápsulas por planta varían ampliamente en el género *tillandsia* (Molina, 1999).

Todas las semillas de tillandsia producen apéndices, que son parte de la testa protectora de la semilla. Estos apéndices, aunque están muy comprimidos dentro del fruto (cápsula), ocupan la mayor parte de cavidad interior. Las semillas están agrupadas en la parte apical de la cápsula (Molina, 1999). El tiempo que toma para que las semillas sean liberadas varía desde tres meses hasta dos años dependiendo de la especie. (Molina, 1999)

Gradualmente la cápsula se seca y las paredes de las tres cámaras hacen que la cápsula lentamente se contraiga, eventualmente alcanzando un punto en el que se separan. La pared de cada cámara se dobla hacia atrás y provee de una gran abertura por donde las semillas se dispersan, generalmente con la ayuda del viento. La estructura de los apéndices sirve para dos propósitos. La forma de paracaídas es eficiente para ser transportada a grandes distancias por el viento siendo ligera y bien balanceada. Así también la disposición radial de los apéndices en las semillas, y la dispersión desde lo alto son ideales para sujetarse a la corteza de los árboles, piedras u otros soportes (Molina, 1999). En la figura 1 se muestra la anatomía de la semilla del género *Tillandsia sp.*

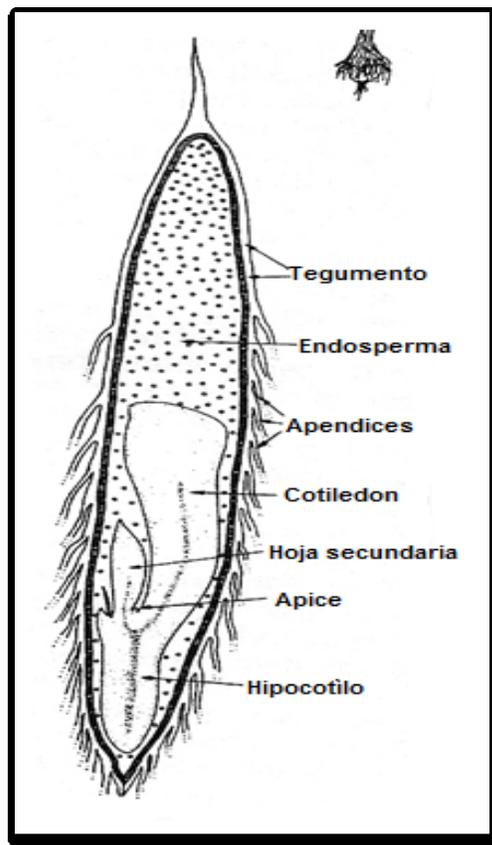


Figura 1 Anatomía de la semilla del género *Tillandsia*

FUENTE: Benzing, 1980

4.1.1.2 Dormancia en semillas del género *Tillandsia* sp.

La dormancia es un mecanismo genético de la semilla y acontece durante el ciclo de vida de la especie, durante la maduración de la semilla, de modo que posterior a la dispersión, la semilla aun no se encuentra apta para germinar. Esta dormancia, que se produce en la fase de maduración de la semilla, se conoce como dormancia primaria. No obstante, en algunas especies, el bloqueo a la germinación se establece luego de la dispersión de la semilla, inducido por condiciones de estrés o por un ambiente desfavorable a la germinación, caracterizando otro tipo de dormancia, denominada dormancia secundaria (Benzing, 1980).

Las semillas germinan en reposo después de la dispersión si hay un entorno cálido y húmedo, pero las semillas dormantes deben recibir pre-acondicionamiento adicional para que puedan germinar. Semillas producidas por muchas plantas anuales perennes de clima templado requieren estratificación (tratamiento en frío) para romper la dormancia. Por lo general seis semanas bajo condiciones de humedad a temperaturas cercanas a cero será suficiente. Semillas que requieren frío contienen hormonas que inhiben el crecimiento en el momento en que fueron dispersadas. Estas desaparecen durante el proceso de estratificación, y otros que promueven la actividad metabólica. Semillas de plantas tropicales no es probable que respondan de un modo particular a un tratamiento de frío (Benzing, 1980).

La dormancia también puede ser por una testa impermeable. La germinación ocurrirá solamente después que esa barrera es agrietada o decaída, haciéndola porosa a la humedad y al oxígeno. Algunas semillas no pueden germinar inmediatamente después de la dispersión porque el embrión es demasiado inmaduro. Durante un período después de madurar, la planta joven continúa su desarrollo dentro de la semilla dispersada. Eventualmente, se alcanza una etapa donde la germinación puede ocurrir (Benzing, 1980).

El género de bromelias mas lento para madurar, a excepción del género *Puya* sp., son las tillandsias atmosféricas adaptados a los hábitat muy secos, estos especímenes crecen rápidamente en presencia de abundante humedad y nutrientes, pero en todos los casos la velocidad de crecimiento son determinados por los factores inherentes a la especie y no por las condiciones de cultivo (Benzing, 1980).

4.1.2 Descripción *Tillandsia xerographica Rohw*

Los individuos de la especie *T. xerographica Rohw* tienen el nombre de la especie (epíteto específico) *xerographica*, el que es una combinación del adjetivo griego “xeros”, que significa “seco” y el nombre “graphics”, que significa pintura. El epíteto es una referencia a la inflorescencia, la que parece hubiera sido coloreada con tiza de color pastel. En las zonas desérticas de su distribución, la planta obtiene humedad del rocío de la madrugada, que humedece la planta en forma frecuente. En su hábitat natural, estas plantas soportan cada año hasta nueve meses sin agua (CONAP, 2006).

4.1.2.1 Características

La especie *T. xerographica Rohw* crece en los bosques de tipo Monte Espinoso, Premontano Seco y Monte Espinoso Seco, a una altitud 10 a 500 metros sobre el nivel de mar (García y Ordóñez, 2008). Es una planta epífita (crece sobre los árboles) y raramente crece sobre el suelo alcanza de 10 a 100 centímetros de altura, es una planta solitaria, con raíces fuertes. Sus hojas se arreglan formando un pseudo tallo rosetado (en forma de rosa), compuesto por 35 a 100 hojas, las láminas de las hojas son planas o encorvadas, más o menos erectas (rectas) raramente retorcidas, son de color gris pálido o blanco plateado, rosado o verde plateado, miden entre 26 a 75 centímetros de largo y de 2 a 5 centímetros de ancho (García y Ordóñez, 2008). Las brácteas (forma de hoja) que recubren la flor, son de color naranja pálido, amarillo o amarillo verdoso (García y Ordóñez, 2008). *T. xerographica Rohw* es una especie de crecimiento muy lento, necesita de 12-18 años para desarrollarse de la semilla a la flor (Zizka, 2003).

En Guatemala *T. xerographica Rohw* se distribuye es en los departamentos de Baja Verapaz, El Progreso y Zacapa. Se encuentra en peligro de extinción por su excesiva extracción selectiva (García y Ordóñez, 2008). En la figura 2 se muestra las características de morfológicas de la especie *Tillandsia xerographica Rohw*.

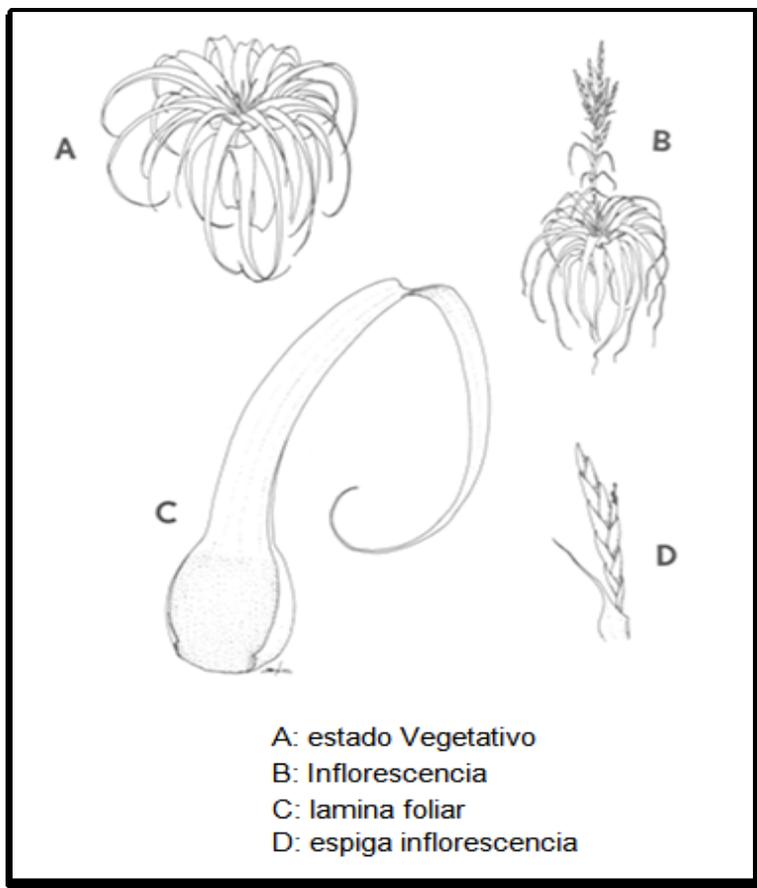


Figura 2 *Tillandsia xerographica* Rohw

FUENTE: CITES, 2003

4.1.2.2 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Bromeliaceae

Género: *Tillandsia*

Especie: *T. xerographica* Rohw

Nombre común: gallito, clavel del aire

(Gerrit y Knapp, 1994)

4.1.2.3 Árboles huéspedes *Tillandsia xerographica* Rohw

Los árboles huésped con mayor cantidad de *T. xerographica* Rohw en orden de importancia son:

- Caraño (*Juliana* sp),
- Guayacán (*Guaiacum sanctum*)
- Manzanote (*Pereskia autumnalis*)
- Roble(*Bucida machrostachya*)
- Cruz de mayo (Apocinaceae)

En general, árboles de diámetros grandes presentan más oportunidad de sostener un mayor número de especies epífitas. Se puede decir empíricamente que *Tillandsia xerographica* Rohw se encuentra especialmente en las partes medias de las ramas. La tendencia de la especie es a crecer en unidades y no en aglomerados. Respecto a competencia, es tolerante a sobrevivir e incluso a crecer pegada a otra (García y Ordóñez, 2008).

4.1.2.4 Población de *Tillandsia xerographica* Rohw

El tamaño estimado de la población normal de *Tillandsia xerographica* Rowh según diferentes expertos es la siguiente:

- En el "Informe de un breve estudio de *Tillandsia xerographica* Rowh en Guatemala", realizado por Chris Schürmann, Gouda y Eric Lieselote Hromadnik, en enero de 2004, se estima una población de 125 plantas/Km², por lo que la especie puede ser considerada biológicamente extinguida (García y Ordóñez, 2008).
- En el documento de Caracterización Ecológica de *Tillandsia xerographica* en el valle del Motagua semiárido, preparado por Selvin Pérez de la Fundación Defensores de la Naturaleza en 2004, reporta la cifra de 140 plantas/ha en áreas naturales poco alteradas. (García y Ordóñez, 2008).

4.1.2.5 Reproducción

A Reproducción sexual

Para el éxito de la fecundación el óvulo de *Tillandsia xerographica* Rohw requiere de la polinización cruzada. Se inicia cuando la planta tiene alrededor de 12 años y es realizado principalmente por pájaros e insectos como mariposas, polillas y ciertas especies de abejas y abejorros. Es importante que las plantas estén situadas a una distancia corta una de la otra (García y Ordóñez, 2008).

En la especie de *Tillandsia* es capaz de producir desde algunas docenas hasta miles de semillas en la temporada reproductiva. Cada flor polinizada produce una cápsula con tres cámaras. (García y Ordóñez, 2008).

Todas las semillas de *Tillandsia* producen apéndices, que son parte de la testa protectora de la semilla. Estos apéndices, están comprimidos dentro de la cápsula, ocupan la mayor parte de cavidad interna de la cápsula.

Las semillas están agrupadas en la parte apical de la cápsula. El tiempo que toma para que las semillas sean liberadas varía desde tres meses hasta dos años dependiendo de la especie. (García y Ordóñez, 2008).

B Reproducción asexual natural

En la naturaleza la reproducción asexual ocurre después de que cae la flor y las semillas maduran, consiste en la producción de brotes que se desarrollan en la parte axial de hojas. El periodo del desarrollo de brotes en la naturaleza es por lo menos de un año antes de que la planta produzca otro brote. Una planta adulta puede producir naturalmente un máximo de tres brotes antes de deteriorarse y morir. Esto significa que después de florecer una planta madre se deteriora y muere en aproximadamente cuatro años (García y Ordóñez, 2008).

C Reproducción asexual en viveros

La producción de brotes axilares, puede inducirse por medio del uso de reguladores de crecimiento. El desarrollo de un brote nuevo puede ser inducido cortando el primer brote cuando alcanza cierto tamaño. En viveros, se han obtenido hasta 6-8 brotes a partir de una planta madre antes de que muera. De esta manera la planta madre puede obtener un mayor

número de brotes durante los años de supervivencia. Es proceso puede incluso aumentar la esperanza de vida de la planta madre hasta seis años después de florecer (García y Ordóñez, 2008).

La germinación de semillas en lo natural, se estima que es muy baja, esta es una de las causas que influye en la reproducción de la especie en su medio natural. Sin embargo, la planta asegura su supervivencia con la producción de brotes, aunque la variabilidad genética no esté garantizada (García y Ordóñez, 2008).

4.1.2.6 *Tillandsia xerographica Rohw* en el ecosistema

En la naturaleza, *Tillandsia xerographica Rohw* se nutre de materia orgánica, depositada en las axilas de sus hojas; tal proceso es importante para la obtención de proteínas y nitrógeno. La especie también acumula agua en las axilas de las hojas, que es utilizado por varios animales como: aves y larvas de insectos.

Los insectos comúnmente encontrados son:

- Formicidae - hormigas 92.2%
- Blattidae – cucarachas 3%,
- Blaberidae – cucarachas gigantes 2,2%
- Reduviidae – chinche 2.5%
- Gryllidae – grillos 0.1%
- Acrididae – saltamontes 0.1%.(García y Ordóñez, 2008).

Las raíces de las plantas están cubiertas por un tejido especial que condensa la humedad del medio ambiente. Las flores producen néctar para alimentar a varias especies nectaríferas que a su vez polinizan las plantas (García y Ordóñez, 2008).

Su alta capacidad fotosintética por medio del Ciclo C-4, le permite a la especie absorber grandes cantidades de CO², sobre todo considerando que el ciclo se produce bajo estrés hídrico y las altas tasas de intensidad de la luz. Este ciclo se ha desarrollado principalmente en las plantas tropicales que ocurren en hábitat seco con ambiente de alta temperatura, como *T. xerographica Rohw* (García y Ordóñez, 2008).

4.1.3 Propagación de *Tillandsia in vitro*

Los documentos encontrados sobre el cultivo de tejidos vegetales del género *Tillandsia* son: “Propagación en vivo e in vitro de cinco especies del género *Tillandsia* en vías de extinción y su potencial uso sustentable” (Orozco, 2011). En la investigación las especies estudiadas fueron: *T. caput-medusae*, *T. pruinosa*, *T. magnusiana*, *T. streptophylla* y *T. plagiotropica*. El medio utilizado para la germinación de las semillas fue el medio basal Murashige y Skoog (MS) a un cuarto de su concentración original, en la germinación semillas de las especies de tillandsias no se reporta dormancia en las semillas, en la publicación no se reporta el tiempo en que germinaron las semillas.

La tesis “Propagación in vivo e in vitro de especies del género *Tillandsia* (bromeliaceae) en el Vivero Clavela Del Aire, S.A. Aldea Sajcavillá, San Juan Sacatepéquez, Guatemala” (Mansilla, 2007) en la investigación la especie estudiada fue *Tillandsia caput-medusae*, se utilizó el medio basal Murashige y Skoog (MS) a la mitad de su concentración para la germinación de las semillas. En la etapa de germinación de las semillas no se reporta dormancia para dicha especie y el tiempo de germinación de las especie *Tillandsia caput-medusae*, fue de 55 días.

En lo que respecta a la germinación de semillas de tillandsia, la fisiología de estas semillas no ha sido estudiada, lo cual representa un obstáculo para la investigación, no obstante esto es una oportunidad para empezar a contribuir al estudio de las semillas de tillandsias.

4.1.4 Aspectos generales que influyen en el cultivo *in vitro*

4.1.4.1 Cultivo tejidos

El cultivo de tejidos in vitro, consiste en el aislamiento de un explante (parte separada de un vegetal) que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La interacción de los distintos factores que intervienen en el cultivo de tejidos determinara la respuesta que se obtenga in vitro (CIAT, 1993).

4.1.4.2 Factores físicos

Los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más estudiados. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C (Mansilla, 2007).

Para propósitos generales se usa en el establecimiento de cultivos tejidos una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación (CIAT, 1993).

4.1.4.3 Medio cultivo

La composición del medio cultivo es un factor determinante para la organogénesis. Los compuestos esenciales son clasificados en:

- Fuentes de carbono
- Nutrientes minerales
- Vitaminas
- Agentes gelificantes (en el caso de medios semisólidos)
- Sustancias reguladoras del crecimiento

A Fuentes carbono

Muy pocos cultivos in vitro son autótrofos. La sacarosa (2%-5%) es el azúcar más utilizado como fuente de carbono (Mansilla, 2007).

Los niveles altos de sacarosa parecen tener un efecto comparable al producido por ácido abscísico. Las concentraciones altas de esta sustancia estimulan la formación de los callos embriogénicos (Lu et al., 1982) y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo tales como la formación de embriones secundarios, la fasciación y la formación de pilocotiledones; también inhiben la germinación precoz (Molina, 1999).

B Nutrientes minerales

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas. En los medios de desarrollo (MS, B5, N6) se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio.

Los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH.

C Vitaminas

Son requeridas en pequeñas cantidades actuando catabólicamente en el metabolismo, la que posee mayor importancia es la tiamina en concentraciones de 0.1 a 0.3 mg/L. Las vitaminas tienen un papel importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Solamente la tiamina es considerada como esencial, mientras que otras como el ácido nicotínico y la piridoxina son agregadas para estimular procesos específicos; sin embargo se incluyen a manera de prevención (Villalobos, 1990).

D Agentes gelificantes

En los medios semisólidos comúnmente se adicionan agar (0.6%-1.0%)- se debe considerar la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas in vitro de los cultivos (Mansilla, 2007).

E Reguladores de crecimiento

En algunos casos se obtiene en los cultivos in vitro las respuestas deseadas mediante el empleo de medios basales sin reguladores de crecimiento. Sin embargo. En la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras del crecimiento, generalmente del tipo auxina o citocininas. Lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas (Mansilla, 2007).

i Giberelinas

Las giberelinas se descubrieron en Japón en la década de 1930 a partir de estudios con plantas de arroz enferma que alcanzaban grandes alturas. A menudo esas plantas eran incapaces de sostenerse por sí mismas y terminaban por morir debido a los daños causados por su propia debilidad y por los parásitos. Desde 1980, los japoneses llamaban a esa enfermedad bakanae (“plántula tonta”), que es causada por el hongo *Gibberella fujikuroi* (el estado asexual o imperfecto de *Fusarium moniliforme*). En 1926, especialistas en patología vegetal descubrieron que extractos del hongo aplicados al arroz causaban los mismos síntomas que el hongo en sí, lo cual demostraba que una sustancia química definida era la responsable de la enfermedad (Weaver, 1976).

En la década de 1930, T. Yabutra y T. Hayashi aislaron un compuesto activo del hongo, al que denominaron giberelina. Por tanto, la primera giberelina se descubrió, al igual que el IIA, y las auxinas sintéticas, la falta de comunicación con los japoneses y, poco más tarde, la Segunda Guerra Mundial los científicos no se interesaron los efectos de las giberelinas. En 1990 se conocían ya 84 giberelinas en varios hongos y plantas. De estas, 74 se encuentran en plantas superiores, 25 en el hongo *Gibberella* y 14 en ambas. Las semillas de la cucurbitácea *Sechium edule* contiene al menos 20 giberelinas, mientras que las semillas de la judía común (*Phaseolus vulgaris*) contiene al menos 16, aunque la mayoría de las especies contienen una cantidad menor (Weaver, 1976).

Todas las giberelinas se derivan del esqueleto entgiberelano. Todas las giberelinas son ácidas y se denominan GA (de *gibberelic acid*), con subíndice para distinguirlas. Todas tienen de 19-20 átomos de carbono, agrupados en cuatro o cinco anillos. La primera giberelina muy activa y desde hace mucho disponible comercialmente. (Purificada del medio de cultivo del hongo *G. fujikuroi*), históricamente se conoce como ácido giberélico (Weaver, 1976)

Las giberelinas existen en las angiospermas, las gimnospermas, los helechos y quizá también en musgos, algas y al menos en dos hongos. Recientemente se han hallado giberelinas en dos especies de bacterias. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es probable que algunas de las 84 giberelinas conocidas sean tan solo precursores fisiológicamente inactivas de otras activas, y otras pueden ser productos inactivados

hidroxilados. No parece probable que cualquier planta dependa de las giberelinas que contiene (Weaver, 1976).

ii Efectos de la giberelinas sobre la germinación de semillas latentes y el crecimiento de yemas latentes

Las semillas de algunas especies silvestres también permanecen latentes cuando se desprenden, y no germinan aunque existan niveles adecuados de humedad, temperatura y oxígeno, la latencia de yemas y semillas con frecuencia es superada (rota) por periodos largos de frío en invierno, permitiendo el crecimiento en primavera, cuando las condiciones son favorables. En el caso de muchas semillas, la latencia se interrumpe exponiéndolas a luz roja breves periodos cuando están húmedas (Weaver, 1976).

Las giberelinas rompen la latencia de semillas de muchas especies, actuando como sustitutos de las bajas temperaturas, los días largos o la luz roja. En las semillas uno de los efectos de las giberelinas es estimular la elongación celular de manera que la radícula pueda empujar a través del endospermo, la cubierta de las semillas o la cubierta del fruto que restringe su crecimiento (Weaver, 1976).

Las giberelinas tienen un efecto en la movilización de alimento y elementos minerales en las células de almacenamiento de las semillas (Weaver, 1976). El ácido giberélico puede provocar cambios a nivel genético que estimula a su vez la síntesis enzimática en las células, así también provoca la estimulación de la síntesis de ARN en las capas de aleurona (Weaver, 1976).

Una de las teorías sostiene que el ácido giberélico tiene relación con la síntesis del ARN mensajero dirigido por ADN en el núcleo. En la actualidad se cree que el ácido giberélico modifica el ARN producido en los núcleos y así puede ejercer su control sobre la expansión celular, así como sobre otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal. El ácido giberélico puede provocar la expansión celular, mediante la inducción de enzimas que debilitan las paredes celulares. Con frecuencia el ácido giberélico incrementa el contenido de Auxinas, transportándolas a su lugar de acción (CIAT, 1993). El ácido giberélico (AG_3) estimula la germinación en ciertas especies de semillas latentes, aumenta la velocidad de germinación, estimula el crecimiento de las plántulas (Weaver, 1976).

Tan pronto como la semilla germina, los sistemas radical y aéreos jóvenes comienzan a usar los nutrientes minerales, las grasas, el almidón y las proteínas presentes en las células de almacenamiento de la semilla la plántula joven depende de estas reservas alimenticias hasta que está en condiciones de absorber sales minerales del suelo y desplegar su sistema aéreo exponiéndolo a la luz. Las sales minerales se translocan con facilidad a través del floema, por todo el sistema aéreo y las raíces jóvenes, siempre que esas sales sean móviles. La plántula tiene un problema con las grasa, los polisacáridos y las proteínas, ya que estas moléculas no se translocan (Weaver, 1976).

El proceso de germinación se inicia en presencia de giberalinas ya que se conoce que esta hormona se desplaza desde las células embrionarias, donde se sintetizan, a la capa de aleurona (capa que rodea el endospermo) en las células de aleurona las giberalinas inducen la producción de alfa amilasa que es segregada al endospermo donde convierte el almidón en azúcar que se transloca a los puntos de crecimiento del embrión. (Santamirano, 2004)

Las giberalinas estimulan la germinación mediante la inducción de enzimas hidrolíticas que debilitan los tejidos que se oponen a la emergencia radicular (ej. Endospermo y la cubierta seminal) movilizan las sustancias de reserva de la semilla, y estimulan la expansión del cotiledón (Bewley y Black, 1994) Las giberalinas también parecen estimular las germinación favoreciendo la vía de transición del desarrollo embriogénico al vegetativo. Las giberalinas intervienen en la desaparición de la proteína de identidad embrionaria FUSCA 3, la cual estimula positivamente la síntesis de ABA ácido abscísico dependiente del embrión o del endospermo en el establecimiento de la dormancia (Iglesias, 2012)

4.2 Marco referencial

4.2.1 Localización del experimento

La investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología y de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Facultad de Agronomía, Edificio T9, Universidad de San Carlos de Guatemala, Campus Central de la Ciudad universitaria Zona 12.

Los laboratorios de cultivo de tejidos, cuentan con un cuarto de incubación con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad y una temperatura de 25 °C. en este laboratorio se realizó el experimento uno y dos. En el Laboratorio de Biotecnología se realizó el experimento tres, este laboratorio no cuenta con un cuarto de incubación, por lo que se utilizó una cámara de incubación ubicada en el Laboratorio de Fisiología Vegetal, con lámparas fluorescentes de luz blanca.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Contribuir al desarrollo de una metodología que permita la propagación de la especie de *Tillandsia xerographica Rohw.*

5.2 Específicos

- Determinar si la temperatura tiene un efecto en la germinación de semillas de la especie *Tillandsia xerographica Rohw* en cultivo in vitro.
- Determinar el efecto de cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semilla de la especie *Tillandsia xerographica Rohw* en cultivo in vitro
- Determinar el efecto del ácido giberélico en medio de cultivo sólido, en la germinación de la semilla de la especie *Tillandsia xerographica Rohw* en cultivo in vitro.

6. HIPÓTESIS

- La temperatura de incubación de 30°C no tiene efecto en la germinación de la semilla de la especie *Tillandsia xerographica Rohw.*
- Al menos uno de los tratamientos de escarificación aplicados a la semilla de la especie *Tillandsia xerographica Rohw* incrementará significativamente la germinación.
- El ácido giberélico (AG₃) aplicado al medio de germinación incrementará la germinación de las semilla de la especie *Tillandsia xerographica Rohw.*

7. MATERIALES Y EQUIPO

7.1 Equipo

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Destilador
- Estereoscopio
- Microondas
- PH-metro
- Termómetro de máxima y mínima
- Timer (Regulador de fotoperíodo)

7.2 Materiales

- Agua destilada
- Alcohol
- Algodón
- Beakers
- Bisturí
- Erlenmeyer
- Espátulas
- Guantes
- Hipoclorito de sodio
- Mecheros
- Micropipeta 100 – 1000 ul
- Papel aluminio
- Papel mayordomo
- Pinzas
- Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml
- Placas petri
- Probetas
- Tubos de ensayo

8. METODOLOGÍA

8.1 Obtención de semillas

La semilla se obtuvo por medio de permiso obtenido en el Departamento de Vida Silvestre del Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Se realizó la solicitud de semillas a los viveros autorizados. Las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw es difícil obtenerlas en forma natural en las cápsulas que las plantas producen por su largo ciclo de reproducción.

La semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw se obtuvieron de la empresa Ornamentales B&G ubicada en Teculután Zacapa. En la figura 3 se muestran cápsulas abiertas en proceso de dispersión de semilla y en la figura 4 se muestran cápsulas cerradas de la especie de la tillandsia estudiada.



Figura 3 Cápsulas abiertas de semilla *T. xerographica* Rohw.



Figura 4 Cápsulas cerradas de semilla *T. xerographica* Rohw.

8.2 Experimentos para incrementar la germinación de *T. xerographica Rohw*

En la investigación se realizaron tres experimentos en la germinación de las semillas de *Tillandsia xerographica Rohw*. En el primer experimento se evaluaron dos tratamientos en los cuales el factor que variaba era la temperatura, en el experimento dos se evaluaron tratamientos de escarificación de semilla y el experimento tres se evaluaron cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG₃) aplicado al medio de germinación. A continuación se describe en forma general los experimentos realizados:

- Experimento 1: Evaluación del efecto de la temperatura de incubación (25°C y 30°C) en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica Rohw* en medio basal MS sólido al 50% de componentes inorgánicos.
- Experimento 2: Evaluación del efecto de cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica Rohw* en medio basal MS semisólido al 100% de componentes inorgánicos.
- Experimento 3: Evaluación de cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG₃) en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica Rohw* aplicado al medio basal MS sólido con 120% de componentes inorgánicos.

En los experimentos uno y tres se utilizaron cápsulas cerradas de *Tillandsia xerographica Rohw* para estos experimentos únicamente se desinfectó la cápsula. En el experimento dos se utilizaron cápsulas abiertas por lo que las semillas fueron desinfectadas.

8.3 Procedimientos Generales

8.3.1 Medio de cultivo

El medio basal utilizado fue Murashige y Skoog (MS) a diferentes concentraciones de sus componentes inorgánicos (50%, 100% y 120%), suplementado con ácido nicotínico, piridoxina y tiamina. Como fuente de carbono se utilizó sucrosa (3%) y Mioinositol. En los medios sólidos y semisólidos se utilizó agar al 0.7% y 0.35% respectivamente. En el experimento 2 a la mitad de las cajas petri de medio de cultivo, por cada tratamiento, se agregó carbón activado para evitar la oxidación de las semillas.

8.3.2 Preparación de los medios de cultivo para la inducción de germinación

Para la preparación de los medios en los cuales se colocaron las semillas para su germinación se procedió de la forma siguiente:

En un beacker de 1000 ml se agregó agua desmineralizada estéril, se introdujo al recipiente una barra magnética y el beacker fue colocado sobre el agitador magnético, el cual se mantuvo con movimiento constante de agitación, posteriormente fueron agregados los componentes del medio Murashige y Skoog, los cuales se muestran en el anexo 1. Los componentes del medio MS se agregaron en el orden siguiente:

- Macronutrientes A: NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 .
- Macronutrientes B: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Micronutrientes A: KI .
- Micronutrientes B: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 .
- Micronutrientes C: Hierro, Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Vitaminas: ácido nicotínico, piridoxina y tiamina.
- Mioinositol.
- Reguladores de crecimiento según el experimento y tratamiento en la dosis a evaluar de ácido giberélico (AG_3) a excepción de los tratamientos testigos que no se adiciono ácido giberélico.
- Sucrosa 3%.

Se aforó la solución para completar al volumen deseado y se determinó el pH el cual se ajusto a 5.7, para esto se utilizó según los valores de pH presentados una solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio a una concentración de 0.1 N según el caso. Se agregó el agente gelificante (agar) y se calentó en el horno microondas por periodos de 30 segundos hasta disolver el agar.

El medio basal preparado se agregó en las cajas petri de vidrio agregando 15 ml de medio/caja y frascos de vidrio agregando 10 ml medio/frasco. Cada caja petri o frasco de vidrio fue identificada según el tratamiento. Todas las cajas de petri y frascos de vidrio se esterilizaron con vapor húmedo en la autoclave durante 20 minutos a una presión de 15 psi y una temperatura de 121 °C. Las cajas de petri y frascos de vidrio fueron almacenados en el cuarto de incubación hasta su utilización.

8.3.3 Procedimientos asépticos

Los procedimientos asépticos utilizados fueron los siguientes:

- Desinfección de cámara de flujo laminar con etanol al 70%. Desinfección de la parte externa de la cristalería a ingresar a la cámara de flujo laminar.
- Los instrumentos metálicos fueron flameados con etanol al 70%.
- El material de vidrio para la disección de semillas (cajas petri) fue esterilizado.
- Los procedimientos de transferencia y disección se realizaron en la cámara de flujo laminar. Al efectuar el trabajo en la cámara de flujo laminar se utilizaron guantes, mascarilla y bata.

8.3.4 Desinfección de cápsulas o semillas

Previo a la siembra en el medio para la germinación, se desinfectaron las cápsulas o semillas, ya en que se utilizaron semillas que se encontraban encapsuladas y semillas fuera de cápsula. Todo el proceso de desinfección se realizó en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar, para ello se siguió el procedimiento siguiente: se humedecieron las cápsulas o semillas en agua destilada estéril posteriormente fueron colocadas en una solución de alcohol etílico al 70%, luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio la cual varió en su concentración de acuerdo al experimento en un rango del 1% al 10%. Finalmente las cápsulas o semillas fueron lavados dos veces con agua destilada estéril, secadas con papel absorbente estéril y colocadas en una caja de petri estéril.

8.3.5 Siembra de semillas

8.3.5.1 Extracción de semillas encapsuladas

En la cámara de flujo laminar se procedió abrir las cápsulas para ello se utilizaron pinzas y bisturí estériles. Se realizó un corte longitudinal en cada cápsula seguido de un corte transversal, se retiraron los apéndices de las semillas, las que fueron extraídas y colocadas en el medio para su germinación.

8.3.5.2 Semillas fuera de la cápsula

A diferencia de las semillas que se encontraban en la cápsula cerrada. Las cápsulas abiertas en la etapa para la dispersión de las semillas, se realizó la desinfección de éstas y

posteriormente en la cámara de flujo laminar fueron colocadas en los medios para su germinación.

8.4 Procedimientos implementados en cada experimento

8.4.1 Experimento 1: Evaluación del efecto de la temperatura de incubación (25°C y 30°C) en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw en medio basal MS solido al 50% de componentes inorgánicos.

8.4.1.1 Metodología

A Desinfección de cápsulas y siembra de semillas

La desinfección de cápsulas se realizó de acuerdo al procedimiento que se describe en el numeral 8.3.4., el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 1% para el tratamiento de 25 °C fue de cinco minutos, el tiempo de inmersión para el tratamiento de 30 °C fue de cinco minutos en una concentración de 5% de hipoclorito de sodio. Una vez desinfectadas, lavadas con agua destilada estéril y secadas las cápsulas, se procedió a extraer las semillas las que fueron colocadas en los frascos con medio para la germinación, en cada uno de los frascos fueron colocadas cuatro semillas.

B Condiciones de incubación

Los frascos conteniendo las semillas para cada uno de los tratamientos fueron incubados de la forma siguiente: para el tratamiento de 25 °C en el cuarto de cultivo y para el tratamiento de 30 °C en una cámara de crecimiento. La radiación fue proveída por lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo programado de 12 horas luz y 12 horas de obscuridad.

C Tratamientos

Los tratamientos evaluados fueron temperaturas de incubación de 25°C y 30 °C

D Diseño experimental, unidad experimental y variable respuesta

El diseño experimental utilizado para análisis fue el completamente al azar con 50 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de vidrio de 120 ml de capacidad al cual se le agregaron 10 ml del medio para la germinación y

en el cual se sembraron 4 semillas. Las variables de respuesta fueron el número de días a germinación y número de semillas germinadas.

E Toma de datos

A partir de la siembra, se realizó 3 lecturas a los 10,15 y 20 días después de la siembra para determinar el número de semillas germinadas

8.4.2 Experimento 2: Evaluación del efecto de cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw en medio basal MS semisólido al 100% de componentes inorgánicos.

8.4.2.1 Metodología

A Tratamientos de escarificación

En este experimento se evaluaron cinco tratamientos de escarificación, siendo estos: corte distal de la semilla, inmersión de semillas en ácido sulfúrico al 40% por 4 horas, lavado en agua continua por 24 horas, inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico e inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico más corte distal. La mitad de las cajas petri de medio de cultivo, por cada tratamiento, se agregó carbón activado para evitar la oxidación de las semillas.

Los tratamientos y la clave que correspondió a cada uno de ellos se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1 Tratamiento de escarificación aplicado a las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw

| Tratamiento | Descripción |
|--------------------|---|
| T1 | Corte distal |
| T2 | Inmersión de semillas en ácido sulfúrico al 40% por 4 horas |
| T3 | Lavado en agua continua por 24 horas |
| T4 | Inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico |
| T5 | Corte distal más inmersión de semillas en solución de ácido giberélico 10 mg/l por 24 horas |

B Descripción de los tratamientos de escarificación aplicados a semillas de *T. xerographica Rohw*

i Corte distal

Antes de aplicar el corte distal a las semillas, las mismas fueron desinfectadas de acuerdo al procedimiento que se describe en el numeral 8.4.2, el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 5% fue de un minuto. Después de desinfectadas las semilla se les realizo un corte de dos milímetros en el lado opuesto a la ubicación del embrión. Este corte fue realizado con bisturí. En la figura 4 se muestra una semilla a la cual se aplicó el tratamiento de corte distal.



Figura 5 Semilla *Tillandsia xerographica Rohw* corte distal

ii Inmersión de semillas en ácido sulfúrico al 40% por 4 horas

Las semillas de *Tillandsia xerographica Rohw* fueron colocadas en inmersión por un periodo de cuatro horas en una solución de ácido sulfúrico al 40% para ello fue utilizado un beacker con capacidad de 150 ml. Antes de colocar las semillas en inmersión les fueron cortados los apéndices. Después de haber colocado las semillas en ácido sulfúrico las mismas fueron desinfectas siguiendo el procedimiento que se describe en el numeral 8.3.4. Con un tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 5% por un minuto. En la Figura 6 se muestra las semillas inmersas en la solución de ácido sulfúrico al 40%.



Figura 6 Semilla *Tillandsia xerographica* Rohw sumergidas en ácido sulfúrico 40%

iii Lavado en agua continúa por 24 horas

Las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw fueron introducidas en una bolsa de tela, esta fue colocada en una malla de plástico, posteriormente fue colocada por 24 horas en una corriente de agua no estéril proveniente de un grifo. Pasadas las 24 horas fueron retiradas las semillas para posteriormente realizar la desinfección de acuerdo al procedimiento que se describe en el numeral 8.3.4. con un tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 5% por un minuto. En la Figura 7 se muestra el lavado continuo realizado a las semillas.

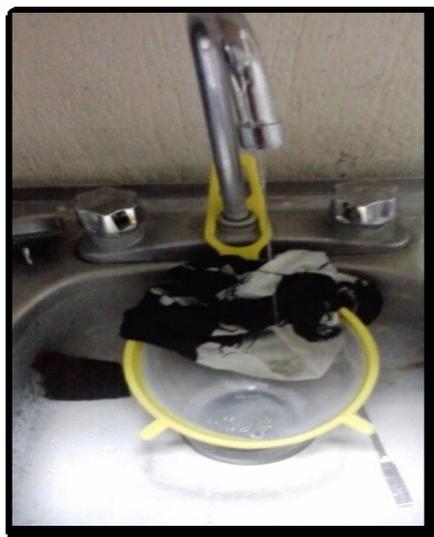


Figura 7 Lavado de semilla *Tillandsia xerographica* Rohw con agua en forma continúa por 24 horas

iv Inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico

Antes de colocar las semillas en la solución con 10 mg/l de ácido giberélico estas fueron desinfectadas de acuerdo al procedimiento que se describe en el numeral 8.3.4 con un tiempo de inmersión en la solución hipoclorito de sodio al 5% de un minuto. Una vez desinfectadas las semillas se colocaron en un frasco con 375 ml de capacidad conteniendo 100 ml de una solución con 10 mg/l de ácido giberélico, en esta solución permanecieron las semillas por un periodo de 24 horas. En la Figura 8 se muestra las semillas sumergidas en la solución de ácido giberélico.



Figura 8 Semilla *Tillandsia xerographica* Rohw sumergidas en AG₃

v Corte distal más inmersión de semillas en solución de ácido giberélico 10 mg/l por 24 horas

Semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw fueron desinfectadas de acuerdo al procedimiento que se describe en el numeral 8.3.4., con un tiempo de inmersión en la solución hipoclorito de sodio al 5% por un minuto. Posteriormente se les aplicó un corte distal de dos milímetros en el lado opuesto a la ubicación del embrión. Este corte fue realizado con bisturí. Después de haber realizado el corte distal las semillas fueron colocadas en una solución estéril que contenía 10 mg/l de ácido giberélico por un periodo de 24 horas. En la Figura 9 se muestra las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw a la cuales se les aplicó el tratamiento de corte distal e inmersión en solución de ácido giberélico

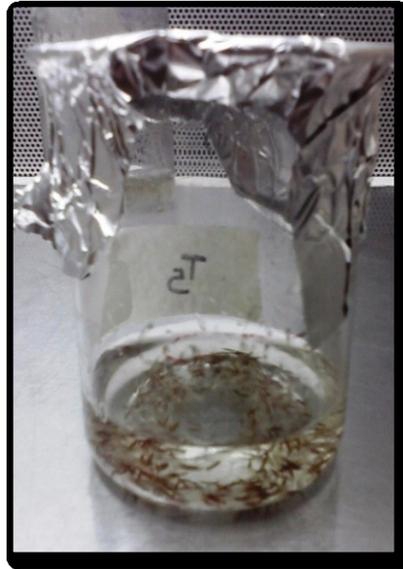


Figura 9 Semilla *Tillandsia xerographica* Rohw con corte distal sumergidas en AG_3

C Siembra de semillas en medio para germinación

Las semillas provenientes de los tratamientos de escarificación fueron colocadas en el medio de germinación el cual fue preparado siguiendo el procedimiento que se muestra en el numeral 8.3.2. Fueron utilizados dos medios de germinación uno con carbón activado y otro sin carbón activado. En cada uno de las cajas de petri conteniendo medio para la germinación fueron colocadas 10 semillas, este procedimiento fue realizado en la cámara de flujo laminar.

D Condiciones de incubación

Las cajas de petri conteniendo las semillas para cada uno de los tratamientos fueron incubados a 25 °C en el cuarto de cultivo. La radiación fue proveída por lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo programado de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad.

E Diseño experimental, unidad experimental y variable respuesta

El diseño experimental utilizado para el análisis fue el completamente al azar con 6 repeticiones por tratamiento. 3 repeticiones con medio de cultivo MS con carbón activado y 3 sin carbón activado.

La unidad experimental estuvo constituida por una caja de petri de 25 ml de capacidad a la cual se le agregaron 15 ml del medio para la germinación y se sembraron 10 semillas. Las variables de respuesta fueron el número de días a germinación y número de semillas germinadas.

F Toma de datos

A partir de la siembra, se realizó 3 lecturas a los 10,15 y 20 días después de la siembra para determinar el número de semillas germinadas

8.4.3 Experimento 3: Evaluación de cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG₃) en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw aplicado al medio basal MS sólido con 120% de componentes inorgánicos.

A Tratamientos

Como medio basal del medio de germinación se utilizó el MS con una concentración del 120% de sus componentes inorgánicos, este medio fue preparado siguiendo el procedimiento que se describe en el numeral 8.3.2. Al medio basal le fue agregado el ácido giberélico en concentraciones de acuerdo a cada uno de los tratamientos.

Los tratamientos fueron los siguientes: 0.1, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/l de ácido giberélico y el testigo. En el cuadro dos se muestran los tratamientos y la clave utilizada para cada uno de ellos.

Cuadro 2 Tratamientos concentraciones AG₃

| Tratamiento | Descripción |
|--------------------|-------------------------------------|
| T1 | MS 120% + 0 mg/l ácido giberélico |
| T2 | MS 120% + 0.1 mg/l ácido giberélico |
| T3 | MS 120% + 0.5 mg/l ácido giberélico |
| T4 | MS 120% + 1.0 mg/l ácido giberélico |
| T5 | MS 120% + 1.5 mg/l ácido giberélico |

B Desinfección de cápsulas y siembra de semillas

La desinfección de cápsulas se realizó de acuerdo al procedimiento que se describe en el numeral 8.3.4. el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio al 10% para los tratamientos fue de dos minutos. Una vez desinfectadas, lavadas con agua destilada estéril y secadas las cápsulas, se procedió a extraer las semillas las que fueron colocadas en los frascos con medio para la germinación, en cada uno de los frascos fueron colocadas cuatro semillas.

C Condiciones de incubación

Los frascos de vidrio conteniendo las semillas para cada uno de los tratamientos fueron incubados a 25 °C en una cámara de incubación. La radiación fue proveída por lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo programado de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

D Diseño experimental, unidad experimental y variable respuesta

El diseño experimental utilizado para análisis fue el completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de vidrio de 120 ml de capacidad al cual se le agregaron 10 ml del medio para la germinación y en el cual se sembraron 4 semillas. Las variables de respuesta fueron el número de días a germinación y numero de semillas germinadas. En la Figura 10 se muestran las unidades experimentales utilizadas en el experimento.



Figura 10 Experimento 3. Unidades experimentales.

E Toma de datos

A partir de la siembra, se realizo 4 lecturas a los 10,15, 20 y 60 días después de la siembra para determinar el número de semillas germinadas.

8.5 Diseño experimental

En los diferentes experimentos de cultivo in vitro, el diseño experimental que se empleo fue una distribución completamente al azar.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta asociada a la ij-ésima unidad experimental

μ = media general de las variables de respuesta

T_i = efecto de la i-ésima tratamiento aplicado

E_{ij} = error experimental asociado a la ij-ésima unidad experimental

8.6 Unidad experimental

La descripción de las unidades experimentales en los diferentes experimentos se presenta en la sección en la cual se detalla la metodología de cada uno de los experimentos (numeral 8.5.1.5, literal D; numeral 8.5.1.2, literal E; numeral 8.5.1.3, literal D).

8.7 Variable de respuesta

Las variable de respuesta fue el número de semillas germinadas, para cada experimento son descritas en la sección en donde se detalla la metodología de cada uno de ellos (numeral 8.5.1.5, literal D; numeral 8.5.1.2, literal E; numeral 8.5.1.3, literal D).

9. RESULTADOS

9.1 Experimento 1: Evaluación del efecto de la temperatura de incubación (25°C y 30°C) en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw en medio basal MS solido al 50% de componentes inorgánicos

9.1.1 Tratamiento 1: incubación de 25°C

Posterior a los cinco días de la siembra de las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw no mostraron germinación alguna. A los 20 días posteriores a la siembra se observó oxidación en las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw en el medio de germinación, presentando éstas una coloración café. En la figura 11 se muestra las unidades experimentales del tratamiento uno que corresponde a la incubación a 25°C.



Figura 11 Unidades experimentales incubadas a 25 °C

9.1.2 Tratamiento 2: incubación de 30°C

Después de cinco días de la siembra las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw no mostraron germinación. A los 15 días posteriores a la siembra se observó oxidación en el medio de germinación y la semilla presentó una coloración café-rojiza, además las semillas mostraron pérdida de turgencia, esto último pudo deberse a la alta temperatura de incubación.

9.2 Experimento 2: Evaluación del efecto de cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw en medio basal MS semisólido al 100% de componentes inorgánicos

De los tratamientos de escarificación aplicados a las semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw se obtuvo germinación únicamente cuando a las semillas se les aplicó corte distal y posteriormente estuvieron inmersas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico. Las semillas germinaron a los 15 días posterior a la siembra en un medio al cual no se le aplicó carbón activado obteniéndose un porcentaje de germinación del 21.66%; con este mismo tratamiento no se obtuvo germinación cuando las semillas fueron colocadas en el mismo medio de germinación con carbón activado. En la Figura 12 se muestra el número de semillas germinadas en el único tratamiento de escarificación en el cual se obtuvo respuesta a la germinación, mencionado arriba y en la Figura 13 se presenta el porcentaje de semillas germinadas en el tratamiento de inmersión de semillas por 24 horas en una solución de ácido giberélico a 10mg/l más corte distal.

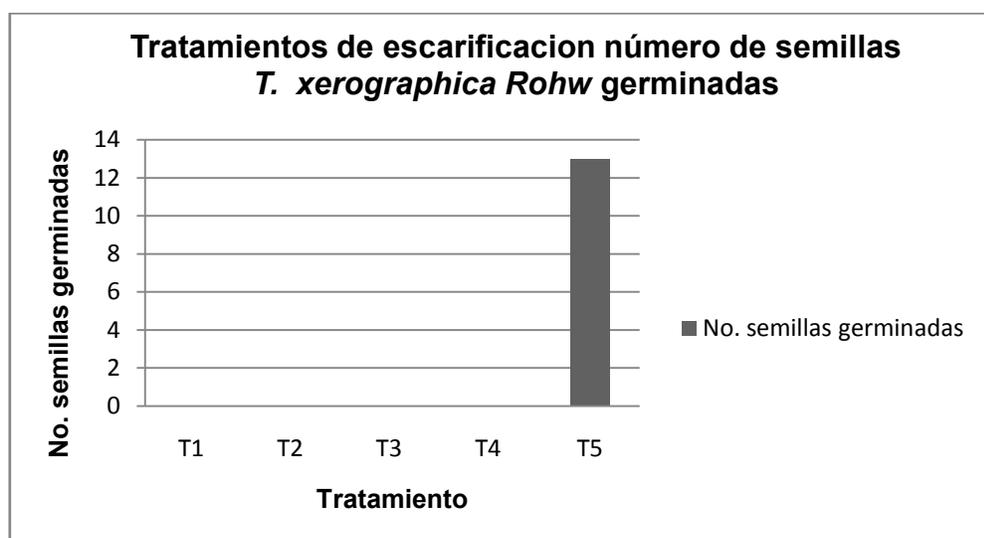


Figura 12 Experimento 2. Número semillas germinadas, en tratamientos de escarificación

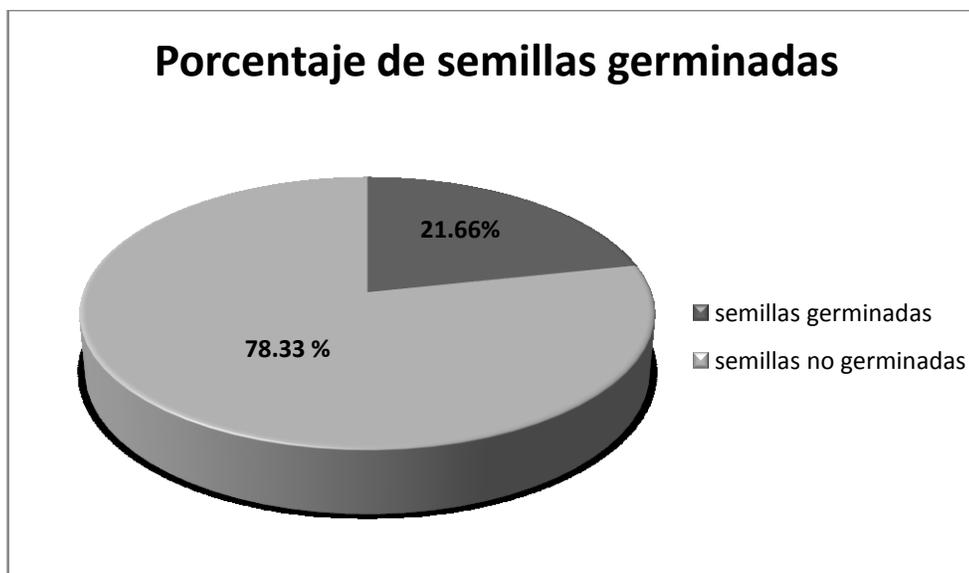


Figura 13 Porcentajes de semillas germinadas en el tratamiento de corte distal más inmersión de semillas por 24 horas en una solución de ácido giberélico a 10mg/l.

En las Figura 14 y 15 se muestra una unidad experimental con semillas germinadas de *Tillandsia xerographica* Rohw correspondiente al tratamiento de escarificación consistente en corte distal e inmersión de semillas por 24 horas en una solución con 10 mg/l de ácido giberélico

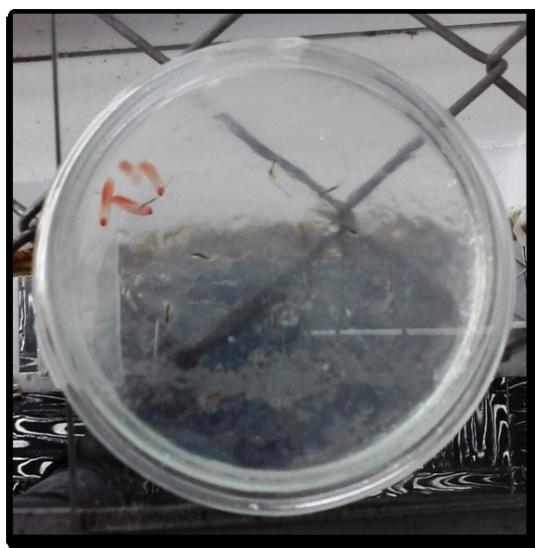


Figura 14 Semillas germinadas *Tillandsia xerographica* Rohw en el tratamiento de corte distal más inmersión de semillas por 24 horas en una solución de ácido giberélico a 10mg/l.



Figura 15 Semillas germinadas *Tillandsia xerographica* Rohw en el tratamiento de corte distal más inmersión de semillas por 24 horas en una solución de ácido giberélico a 10mg/l.

En la Figura 16 se muestra las unidades experimentales de la evaluación del efecto de los cinco tratamientos de escarificación en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw. Las cajas de petri con medio que muestra color negro son aquellas a las cuales se adicionó carbón activado y las cajas de petri con medio transparente son aquellas a las que no se adicionó carbón activado.



Figura 16 Experimento 2: tratamientos de escarificación. Unidades experimentales

9.3 Experimento 3: Evaluación de cuatro concentraciones de ácido giberélico (AG₃) en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw aplicado al medio basal MS solido con 120% de componentes inorgánicos.

Posterior de 60 días en medios de germinación el tratamiento con la mayor concentración de ácido giberélico (1.5 mg/l) mostró el mayor porcentaje de germinación, siendo este del 18% el cual corresponde al tratamiento cinco. Los tratamiento cuatro y tres de ácido giberélico con una concentración de 1.0 mg/l y 0.5 mg/l mostraron ambos el 8% de germinación. Por otra parte el tratamiento dos de 0.1 mg/l ácido giberélico y el testigo ambos tuvieron el 3% de germinación. En estos tratamientos no se observó oxidación en el medio de germinación ni en la semilla, es por ello que la toma de datos se realizó a los 60 días después de la siembra.

En la Figura 17 se muestra el porcentaje de semillas germinadas de la especie *Tillandsia xerographica* Rohw por cada uno de los tratamientos evaluados de las concentraciones de ácido giberélico.

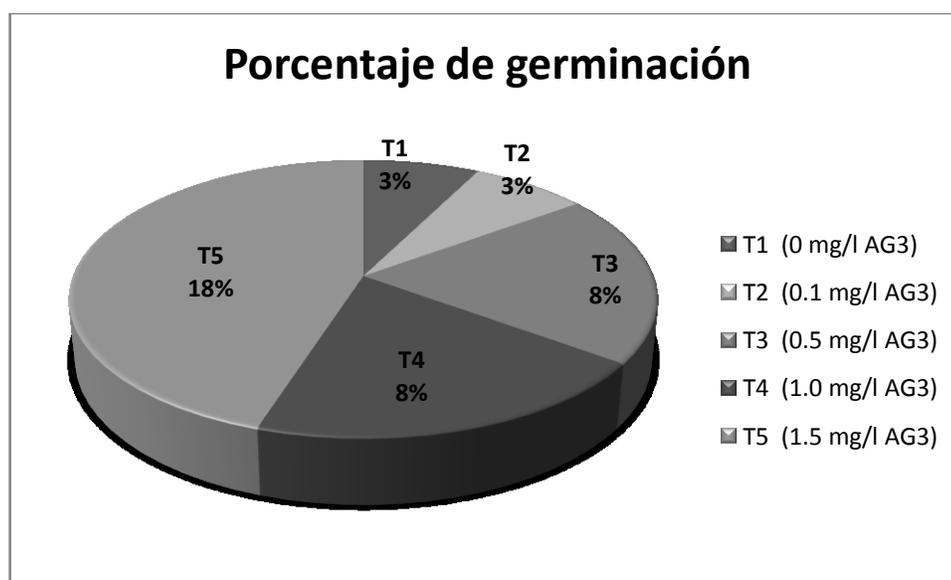


Figura 17 Experimento 3. Porcentaje de germinación de semillas *Tillandsia xerographica* Rohw

En la Figura 18 se muestra una unidad experimental con cuatro semillas sembradas y únicamente una semilla de la especie *Tillandsia xerographica* Rohw germinada. Y en la Figura 19 se presenta una ampliación de una semilla germinada

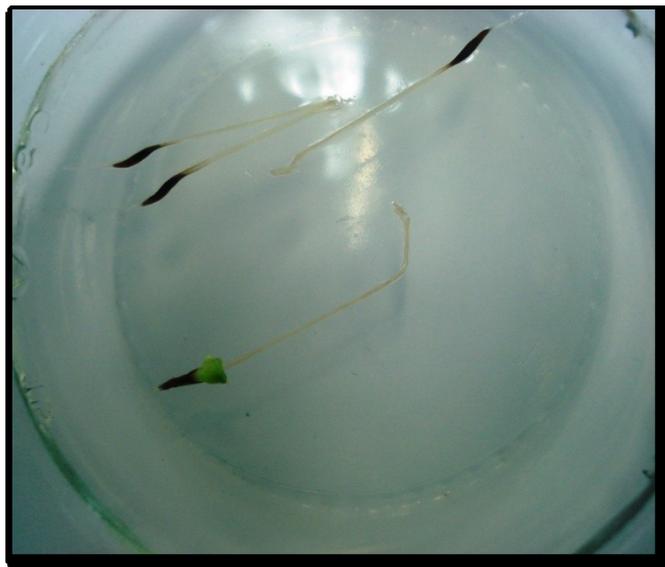


Figura 18 Semillas de *Tillandsia xerographica* Rohw en medio cultivo MS120% de componentes inorgánicos



Figura 19 Semilla germinada de *Tillandsia xerographica* Rohw

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según Roca y Mroginski (1993) una temperatura entre 25 °C y 28 °C son adecuadas para el establecimiento de cultivo de tejidos, la temperatura de 25 °C no causó deshidratación en la semillas en comparación a la temperatura de incubación de 30 °C la cual provocó deshidratación de las semillas de *T. xerographica Rohw.* Se utilizó una temperatura de 30 °C ya que la especie en *T. xerographica Rohw* en su hábitat natural soporta temperaturas arriba de los 25 °C.

La presencia de ácido de giberélico, en el medio o en la solución en la cual fueron inmersas las semillas fue un factor que influyó en el incremento de la germinación. En el tratamiento en el cual se realizó el corte distal y las semillas fueron inmersas en una solución conteniendo 10 mg/l ácido giberélico se obtuvo el 21.66% de germinación, mientras que cuando se utilizó el ácido giberélico en diferentes concentraciones en el medio de germinación se obtuvo germinación en todos los tratamientos, a mayor concentración de ácido giberélico en el medio se obtuvo un mayor porcentaje de germinación en las semillas.

La aplicación de corte distal a las semillas de *T. xerographica Rohw* y la inmersión de estas en una solución conteniendo 10mg/l de ácido giberélico promovió la germinación. El inductor de la germinación fue el ácido giberélico, lo anterior se afirma debido a que a las semillas a las que se aplicó corte distal y no fueron inmersas en una solución conteniendo ácido giberélico no germinaron.

Benzing, (1980) reporta dormancia en tillandsias que crecen en zonas áridas, en este trabajo al utilizar ácido giberélico ya sea en la solución de la inmersión de las semillas a las que les aplicó corte distal o en el medio de germinación, se obtuvo germinación, lo cual es congruente con lo reportado por Benzing, ya que el ácido giberélico es un regulador del crecimiento que se emplea en semillas para interrumpir la dormancia. Weaver, (1985) reporta que el ácido giberélico puede provocar la expansión celular, mediante la inducción de enzimas que debilitan las paredes celulares. Con frecuencia el ácido giberélico incrementa el contenido de Auxinas, transportándolas a su lugar de acción. El ácido giberélico (AG₃) estimula la germinación en ciertas especies de semillas latentes, aumenta la velocidad de germinación, estimula el crecimiento de las plántulas y supera el enanismo de los epicótilos latentes.

De los tratamientos de escarificación el más adecuado es el corte distal con inmersión de las semillas en una solución conteniendo ácido giberélico. El corte que se realiza en la semilla permite el ingreso de agua, oxígeno y ácido giberélico al interior de la semilla factores que son importantes para la germinación. La presencia de agua hidrata la semilla, se facilita el metabolismo con la presencia del oxígeno y la presencia de ácido giberélico induce el metabolismo de las sustancias de reserva. En el tratamiento de escarificación en el cual no se realizó corte distal, sino solo se tuvo inmersa la semilla en una solución conteniendo ácido giberélico a una concentración de 10mg/l no se produjo germinación, caso contrario ocurrió al realizar corte distal.

11. CONCLUSIONES

- Las semillas de *Tillandsia xerographica Rohw* incubadas a 30 °C se deshidratan, mientras que incubadas a 25 °C no se deshidratan.
- Los tratamientos de escarificación siguientes: corte distal, inmersión en ácido sulfúrico al 40% por cuatro horas, lavado en agua continua por 24 horas e inmersión en una solución de ácido giberélico 10 mg/l por 24 horas no indujeron germinación en las semillas de *Tillandsia xerographica Rohw*. El tratamiento de corte distal de la semilla de *Tillandsia xerographica Rohw* seguido de inmersión de la semilla por 24 horas en una solución de ácido giberélico es un tratamiento de escarificación que incrementa la germinación.
- El ácido giberélico aplicado al medio de germinación tiene efecto en la germinación de la semilla de *Tillandsia xerographica Rohw*. A mayor concentración de ácido giberélico aplicado al medio, en los rango de 0.1 a 1.5 mg/l, se obtuvo un mayor número de semillas germinadas

12. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto en la germinación de semillas de *Tillandsia xerographica Rohw*, del tratamiento de escarificación de corte distal de la semilla, colocada posteriormente en medio de cultivo MS semisólido al cual se le agregue ácido giberélico en un rango de 1.5 a 5 mg/l .
- Evaluar el efecto del ácido giberélico en la germinación de las semillas de *Tillandsia xerographica Rohw*, en un rango de concentraciones entre 1.5 a 5 mg/l, aplicado al medio de germinación (MS semisólido).

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Benzing, D. 1980. Biology the bromeliad. US, Universidad de Michigan. 170 p.
2. Castañeda, H. 2003. Descripción de *Tillandsia xerographica* (en línea). Guatemala, Universidad Francisco Marroquín, Arboretum. Consultado 7 abr 2010. Disponible en <http://www.arboretum.ufm.edu/plantas/familias.asp?id=500&familia=Bromeliaceae>
3. CIAT, CO. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Roca, WM y Mroginski, LA eds. Cali, Colombia. 970 p. (Publicación CIAT 151).
4. CONAP (Consejo Nacional de Áreas Protegidas, GT). 2006. Lista especies amenazadas en Guatemala (en línea). Guatemala. Consultado 9 abr 2010. Disponible en <http://www.conap.gob.gt/Members/admin/documentos/documentos-centro-de-documentacion/fauna/Listado%20de%20especies%20amenazadas.pdf>
5. García, M; Ordóñez Chocano, H. 2008. Case study: *Tillandsia xerographica* (en línea). México, NDF Workshop case studies, WG 2 – Perennials. Consultado 5 abr 2010. Disponible en http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/TallerNDF/Links-Documentos/Casos%20de%20Estudio/Perennials/WG2%20CS7.pdf
6. Gerrit, D; Knapp, S. 1994. Flora de Mesoamérica: psilotaceae a Salviniaceae (en línea). Ed. por Gerrit Davidse, Mario Sousa Sánchez y Sandra Knapp. México, Universidad Nacional Autónoma (UNAM), Instituto de Biología. v. 6, 543 p. Consultado 7 abr 2010. Disponible en http://books.google.com.gt/books?id=Oh5dkK0WoLAC&dq=Flora+de+mesoamerica&source=gbs_navlinks_s
7. Hernández T, MA. 2000. Respuesta de la planta zarzaparrilla (*Smilax moranensis* Mortens y Galiotti al cultivo de tejidos *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 77 p.
8. Iglesias Fernández, R. 2012. El cross-talk etileno/giberelinas y la rotura de la dormición de semillas de *Sisymbrium officinale* L. provocada por el after-ripening. Tesis PhD. España, Universidad Santiago de Compostela, Facultad de Biología. 191 p. Consultado 28 mar 2013. Disponible en http://books.google.com.gt/books?id=UZ5hZdxl7e0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
9. Mansilla Méndez, JR. 2007. Propagación *in vivo* e *in vitro* de especies del género *Tillandsia* (bromeliaceae) en el vivero Clavela del Aire, S.A. aldea Sajcavillá, San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 81 p.

10. Molina Aceves, N. 1999. Germinación *in vitro* y micro propagación de *Tillandsia califanii* (en línea). México, Universidad Autónoma Metropolitana, Proyecto Docente de Investigación. p.1-3. Consultado 12 abr 2010. Disponible en <http://148.206.53.231/UAM3384.PDF>
11. Monzón Rivera, DE. 2008. Análisis de los problemas ambientales que causan la extinción de la flora silvestre guatemalteca y su regulación legal. Tesis Lic. CC. Jurídicas. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Jurídicas. 120 p.
12. Orozco Castillo, CA. 2011. Propagación *in vivo* e *in vitro* de cinco especies del género *Tillandsia* en vías de extinción y de potencial uso sustentable. Guatemala, FONACYT / CONCYT / SENACYT. 106 p. (Proyecto FODECYT no. 04-2006).
13. Pérez, ES. 2004. Caracterización ecológica de *Tillandsia xerographica* en el valle del Motagua (en línea). *In* Seminario de investigación para la conservación de la región semiárida del valle del Motagua (2004, Guatemala). Libro de resúmenes. Ed. por Andrea Nájera. Guatemala, Fundación Defensores de la Naturaleza. p. 15-16. Consultado 10 abr 2010. Disponible en http://www.parksinperil.org/files//s_inv_rsavm04.pdf
14. Santamarina Siurana, MP. 2004. Prácticas de biología y botánica (en línea). Ed. por Santamarina Maria y Francisco García Breijo. España, Universidad Politécnica de Valencia. 279 p. Consultado 28 mar 2013. Disponible en <http://books.google.com.gt/books?id=Z6xAlPkeecsC&pg=PA263&dq=giberelinas+y+germinacion+de+semillas&hl=es&sa=X&ei=c655UeHrBuPG0wHx6IHADQ&ved=0CFwQ6AEwBw#v=onepage&q=giberelinas%20&f=false>
15. Villalobos, VM. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma, Italia, FAO. p. 3-41. (Cuadernillo 105).
16. Weaver, RJ. 1985. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Cotín. México, Trillas. 622 p.
17. Zizka, G; Frankfurten, M. 2003. Bromeliácea, *Tillandsia xerographica*, apéndice II, Rohweder Trad. Alemania, CITES. p. 1-2. Consultado 8 jul 2010. Disponible en [ww.cites.org/esp/resources/ID/flora/Tillandsia%20xerographica_S.pdf](http://www.cites.org/esp/resources/ID/flora/Tillandsia%20xerographica_S.pdf)

14. Anexos

Anexo 1. Componentes del medio MS

| # | NOMBRE DEL COMPUESTO | FÓRMULA | MS 50% mg/l | MS 100% mg/l | MS 120% mg/l |
|--------------------------------|--------------------------------------|--|-------------------|--------------------|--------------------|
| I MACRONUTRIENTES | | | | | |
| 1 | nitrate de amonio | NH ₄ NO ₃ | 825 | 1650 | 1980 |
| 2 | nitrate de potasio | KNO ₃ | 950 | 1900 | 2280 |
| 3 | sulfato de magnesio heptahidratado | MgSO ₄ .7H ₂ O | 185 | 370 | 444 |
| 4 | dihidrogeno fosfato de potasio | KH ₂ PO ₄ | 85 | 170 | 204 |
| II MICRONUTRIENTES "A" | | | | | |
| 1 | ácido bórico | H ₃ BO ₃ | 3.1 | 6.2 | 7.44 |
| 2 | sulfato de manganesio monohidratado | MNSO ₄ .H ₂ O | 11.15 | 22.3 | 26.76 |
| 3 | sulfato de zinc heptahidratado | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 4.3 | 8.6 | 10.32 |
| 4 | molibdato de sodio dihidratado | Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O | 0.125 | 0.25 | 0.3 |
| III MICRONUTRIENTES "B" | | | | | |
| 1 | sulfato de cobre pentahidratado | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.0125 | 0.025 | 0.03 |
| 2 | cloruro de cobalto hexahidratado | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.0125 | 0.025 | 0.03 |
| IV IODURO DE POTASIO | | | | | |
| 1 | ioduro de potasio | KI | 0.415 | 0.83 | 0.996 |
| V CLORURO DE CALCIO | | | | | |
| 1 | cloruro de calcio dihidratado | CaCl ₂ .2H ₂ O | 220 | 440 | 528 |
| VI Myo-INOSITOL | | | | | |
| 1 | Myo- inositol | C ₆ H ₁₂ O ₆ | 50 | 100 | 120 |
| VII SOLUCION DE HIERRO | | | | | |
| 1 | cristales de sal disodio dihidratada | Na ₂ EDTA | 18.65 | 37.3 | 44.76 |
| 2 | sulfato de hierro heptahidratado | FeSO ₄ .7H ₂ O | 13.9 | 27.8 | 33.36 |
| VIII VITAMINAS | | | | | |
| 1 | ácido nicotínico | C ₆ H ₅ NO ₂ | 0.25 | 0.5 | 0.6 |
| 2 | pyridoxol hydrochloride | C ₈ H ₁₂ ClNO ₃ | 0.25 | 0.5 | 0.6 |
| 3 | tiamina monoclohidrica HCl | C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS.H ₂ O | 0.05 | 0.1 | 0.12 |
| 4 | glicina | H ₂ NCH ₂ COOH | 1 | 2 | 2.4 |
| IX | agar | 0.7% | 3500 | 7000 | 8400 |
| X | sucrosa | 3% | 15000 | 30000 | 36000 |

Anexo 2. Preparación Soluciones Concentradas

La preparación de soluciones madres se realizaran en función de los componentes del medio basal a utilizar Murashige y Skoog .la preparación de las soluciones concentradas es el primer paso para la preparación de medios de cultivo.

Las soluciones concentradas se prepararan en función de los componentes del medio Murashige y Skoog 1962 (MS). A continuación se describe la forma en que se realizara la preparación de las soluciones patrón para el medio Murashige y Skoog.

Soluciones concentradas de macronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog (MS)

Se prepararan 500 ml de cada solución A y B con una concentración de 10X cada una, los componentes de cada solución se describen a continuación:

Cuadro 3 Componentes macronutrientes A medio MS

| Componente | Peso (grs.) |
|---------------------------------------|-------------|
| NH ₄ NO ₃ | 8.25 |
| KNO ₃ | 9.5 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 1.85 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.85 |

Cuadro 4 Componentes macronutrientes B medio MS

| Componente | Peso (grs.) |
|---------------------------------------|-------------|
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 2.2 |

- Cada solución se prepara por separado.
- Se pesaran los componentes para cada solución en la balanza analítica vertiéndolos en el beacker de 250 ml con agua desmineralizada estéril.
- Se agitara hasta observar que todos los componentes se disuelvan, el contenido se trasladara a una probeta de 1000 ml.
- se aforara con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen de 500ml.
- se vuelve a agitar la solución y cada solución se guardara en frascos esterilizados identificado y tapados adecuadamente, estos se guardaran hasta su uso en una refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

Soluciones concentradas de micronutrientes del medio nutritivo Murashige y Skoog (MS)

Se prepararan 100 ml de soluciones de micronutrientes A-B y 50ml de solución micronutriente C. todas las soluciones con una concentración de 100X cada una, los componentes de cada solución se describen a continuación.

Cuadro 5 Componentes micronutrientes A medio MS

| Sustancia | Peso (grs.) |
|------------------|--------------------|
| KI | 0.0083 |

Cuadro 6 Componentes micronutrientes B medio MS

| Sustancia | Peso (grs.) |
|---------------------------------------|--------------------|
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 0.223 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0.086 |
| H ₃ BO ₃ | 0.062 |

Cuadro 7 Componentes micronutrientes C medio MS

| Sustancia | Peso (grs.) |
|---|-------------|
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.00125 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.00125 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.00125 |

- Cada solución se preparara por separado.
- Para la solución micronutrientes A y B se pesaran los componentes para cada solución en la balanza analítica vertiéndolos en el beacker de 100 ml con 50ml agua desmineralizada estéril.
- Se agitara hasta observar que todos los componentes se disuelvan, el contenido se trasladara a una probeta de 100 ml.
- se aforara con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen de 100ml.
- Para la solución micronutrientes C se pesaran los componentes para la solución en la balanza analítica vertiéndolos en un beacker de 100ml con 25 ml de agua desmineralizada estéril.
- Se agitaran los componentes hasta que se disuelven, el contenido se trasladara a una probeta de 100ml.
- Se aforara con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen de 50ml.
- se vuelve a agitar la solución y cada solución se guardara en frascos esterilizados identificado y tapados adecuadamente, estos se guardaran hasta su uso en una refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

Solución concentrada de hierro

Se preparara una solución de 100 ml con una concentración de 100X

- En un beacker se colocara 50 ml de agua desmineralizada estéril
- El beacker se colocara en la estufa
- Se agregara al agua caliente 0.373 gr de Na₂EDTA

- Disuelto Na₂EDTA se segregará 0.278 gr. de FeSO₄·7H₂O.
- Disueltos los elementos, la solución se aforara en una probeta al volumen deseado de 100ml
- Se dejara enfriar la solución
- se vuelve a agitar la solución y se guardara en un frasco esterilizado identificado y tapado adecuadamente, este se guardara hasta su uso en una refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

Solución concentrada de vitaminas

Se preparara una solución de 50 ml con una concentración de 1000X para lo cual se pesara 0.005gr. de Tiamina (HCL). Luego se verterán en un beacker de 100 ml que contenga 25 ml de agua desmineralizada estéril se agitara. Disuelto el compuesto se aforara en una probeta aforando al volumen deseado de 50ml, la solución se trasladara a un envase de vidrio, se identificara y guardara en una refrigeradora 4°C.

Solución concentrada de Mioinositol

Se preparara una solución Mioinositol de 100 ml con una concentración de 1000X para lo cual se pesara 10gr. Mioinositol. Luego se verterán en un beacker de 100 ml que contenga 25 ml de agua desmineralizada estéril se agitara. Disuelto el compuesto se aforara en una probeta aforando al volumen deseado de 100ml, la solución se trasladara a un envase de vidrio, se identificara y guardara en una refrigeradora 4°C.