

Evaluación de tratamientos pregerminativos de heno (*Tillandsia usneoides* L.) en condiciones *in vitro*

Evaluation of pregerminative treatments of hay (*Tillandsia usneoides* L.) under *in vitro* conditions

Recepción del artículo: 04/12/2023 • Aceptación para publicación: 30/12/2023 • Publicación: 05/01/2024

<https://doi.org/10.32870/e-cucba.vi21.337>

Virgen Luján-Santiago
Edna Fabiola Valdez-Hernández*
Ma. De Jesús Juárez-Hernández

Román Sánchez-Carrillo
Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Texcoco,
Edo de México, México.

Xareni Vázquez-Flores
Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Boca del Río.
Boca del Río, Veracruz, México.

*Autor para correspondencia: ednafvh5@hotmail.com

Resumen

Tillandsia usneoides L., conocida comúnmente como “heno” es una planta con hábito de crecimiento epífita, se encuentra dentro de las bromelias de tipo atmosférico que comprende las plantas pequeñas cuyas hojas están densamente cubiertas de tricomas; son de lenta reproducción y lento crecimiento, a menudo se obtiene de extracción ilegal del medio silvestre. Por lo que el objetivo del presente es observar la propagación *in vitro* de *Tillandsia usneoides* L., se evaluaron 12 tratamientos pregerminativos: (T1) temperatura ambiente, (T2) remojo 12 horas, (T3) TDZ 0.22 mg·L⁻¹, (T4 y T5) nitrato de potasio 0.1 % y 0.2 %, (T6 y T7) giberelinas 50 mg·L⁻¹ y 150 mg·L⁻¹, (T8 y T9) agua oxigenada 10 % y 20 %, (T10 y T11) quitosán 250 mg·L⁻¹ y 500 mg·L⁻¹ y (T12) 2,4-D 0.22 mg·L⁻¹. Las semillas fueron establecidas en agua desionizada y agar-agar Deiman®, 5.5 g·L⁻¹, pH a 5.5. El análisis de varianza ($p \leq 0.05$ %) no mostró diferencias estadísticas significativas. El tratamiento con mayor número de semillas que iniciaron el proceso de germinación y mayor número de plantas fueron las giberelinas 50 mg·L⁻¹. La mayor contaminación se observó en el tratamiento nitrato de potasio 0.1 %.

Palabras clave: Propagación, latencia, bromelia, germinación, plántula.

Abstract

Tillandsia usneoides L., commonly known as “Spanish moss” is a plant with an epiphytic growth habit, it is found within the atmospheric type bromeliads that comprise small plants whose leaves are densely covered with trichomes; They are slow to reproduce and slow to grow, often obtained from illegal extraction from the wild. Therefore, the objective of this study is to observe the *in vitro* propagation of *Tillandsia usneoides* L., 12 pregerminative treatments were evaluated: (T1) room temperature, (T2) soaking for 12 hours, (T3) TDZ 0.22 mg·L⁻¹, (T4 and T5) potassium nitrate 0.1% and 0.2%, (T6 and T7) gibberellins 50 mg·L⁻¹ and 150 mg·L⁻¹, (T8 and T9) hydrogen peroxide 10% and 20%, (T10 and T11) chitosan 250 mg·L⁻¹ and 500 mg·L⁻¹ and (T12) 2,4-D 0.22 mg·L⁻¹. The seeds were established in deionized water and Deiman® agar, 5.5 g L⁻¹, pH 5.5. The analysis of variance ($p \leq 0.05\%$) did not show significant statistical differences. The treatment with the highest number of seeds that started the germination process and the highest number of plants was gibberellin 50 mg·L⁻¹. The greatest contamination was observed in the 0.1% potassium nitrate treatment.

Keywords: Propagation, dormancy, bromeliad, germination, seedling.

Introducción

La bromelia *Tillandsia usneoides* L., conocida comúnmente como “heno” es una planta con hábito de crecimiento epífita, se encuentra dentro de las *Tillandsias* de tipo atmosférico que comprende las plantas pequeñas cuyas hojas están densamente cubiertas de tricomas (Granados, 2005), con distribución en Guatemala, Sureste de los Estados Unidos, México, Argentina y Chile (Véliz, 2010); se hallan en la mayoría de los tipos de vegetación del país: pinares, encinares, bosques húmedos, matorrales y selvas; habita en altitudes de 0-3,200 msnm (Miranda *et al.*, 2007) y posee un alto valor ornamental. Esta especie está siendo amenazada, por la reducción de su hábitat natural debido a la deforestación, así como la extracción de su hábitat natural (Silveira, 2009). Por otra parte, la lenta reproducción y sus largos periodos de crecimiento son factores que también forman parte de la problemática.

La micropropagación se considera una técnica importante para optimizar la producción de estas plantas. El uso de semillas como explante para cultivo in vitro resulta atractiva por razones económicas y prácticas, puede ser un medio para aumentar la germinación y mejorar las tasas de crecimiento teniendo como componente adicional el tratamiento de los recursos genéticos (Silveira *et al.*, 2009). Para acelerar el proceso de germinación se recurre a tratamientos pregerminativos, haciendo uso de los reguladores de crecimiento (Ludeña, 2012).

El desarrollo de esta investigación busca una estrategia a través del cultivo in vitro que favorezca la germinación en *Tillandsia usneoides* L., con objeto de evaluar diferentes tratamientos pregerminativos para su propagación, así como para definir cuáles son las etapas de germinación o etapas de crecimiento.

Materiales y métodos

Ubicación del estudio

Este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología, del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Tillandsia usneoides*, fueron obtenidas del parque ecoturístico el Cedral, en la comunidad de San Pablo Izayoc, Texcoco, Estado de México.

Medio de cultivo

Se usó como medio de cultivo agua desionizada con el agente gelificante agar de la marca Deiman®, 5.5 g·litro⁻¹, ajustado el pH a 5.5.

Manejo de semilla

Se eliminó la coma de las semillas; posterior a ello se cuantificó grupos de 40 semillas colocándolas en pequeños sobres de papel filtro para facilitar su manejo en cada tratamiento.

Posterior a ello se lavó las semillas dentro de una cámara para cultivo in vitro con el protocolo recomendado por García-Granados *et al.* (2023) (explicado en el experimento uno), después se sometieron las semillas a pretratamiento durante una hora dentro de la misma cámara.

Por último, se abrieron los sobres individualmente y se sembraron diez semillas por frasco, se sellaron los frascos con cinta film; posteriormente se incubaron en condiciones predeterminadas. Para el factor de luz, se suministró una lámpara fluorescente con 1500 luxes y una temperatura de 26 °C.

Tratamientos

Se establecieron 12 tratamientos, las cuales consistieron en semillas almacenadas desde el día de cosecha a temperatura ambiente y sometidas al enjuague antes mencionado. T1, testigo sólo recibió las condiciones antes mencionadas y los otros 11 tratamientos fueron sometidas a tratamientos señalados en el Cuadro 1.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones, donde cada unidad experimental fue un frasco con diez semillas.

Cuadro 1. Tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de *Tillandsia usneoides* para observar su germinación *in vitro*.

Tratamientos	Pregerminativo
T1	Temperatura ambiente
T2	Remojo 1 hora
T3	TDZ 0.22 mg·litro ⁻¹
T4	Nitrato de potasio 0.1%
T5	Nitrato de potasio 0.2%
T6	Giberelinas 50 mg·litro ⁻¹
T7	Giberelinas 150 mg·litro ⁻¹
T8	Agua oxigenada 10%
T9	Agua oxigenada 20%
T10	Chitosan 250 mg·litro ⁻¹
T11	Chitosan 500 mg·litro ⁻¹
T12	2,4-D 0.22 mg·litro ⁻¹

Variables respuesta

Los experimentos se monitorearon tres veces por semana durante 38 días, registrando las siguientes variables: germinación: se considerará semilla germinada cuando la cubierta de la semilla esté rota. Porcentaje de germinación, porcentaje de necrosamiento, porcentaje de contaminación, porcentaje de plantas normales.

Análisis estadístico

Para el análisis de las variables se usó el análisis de varianza y cuando se presentaron diferencias, se aplicó la prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el software estadístico SAS versión 9.0.

Resultados y discusión

En el experimento realizado se identificó el proceso de germinación, así como siete categorías según las etapas de desarrollo del embrión, para la obtención de plántulas de heno:

- Etapa 0: ‘sin germinación’. No se produce crecimiento del embrión.
- Etapa 1: ‘pregerminación’. La semilla comienza a hincharse.
- Etapa 2: ‘germinación’. Se observa el rompimiento de la testa y una coloración verde pálido en la semilla hinchada.
- Etapa 3: ‘curva’. La semilla hinchada comienza con una curvatura.
- Etapa 4: ‘disparo’. Se forma una protrusión.
- Etapa 5: ‘primera hoja’. Se observan los indicios de la primera hoja.
- Etapa 6: ‘crecimiento primera hoja’. El tamaño de la hoja va incrementando.
- Etapa 7: ‘segunda hoja’. Se observan indicios de la segunda hoja.

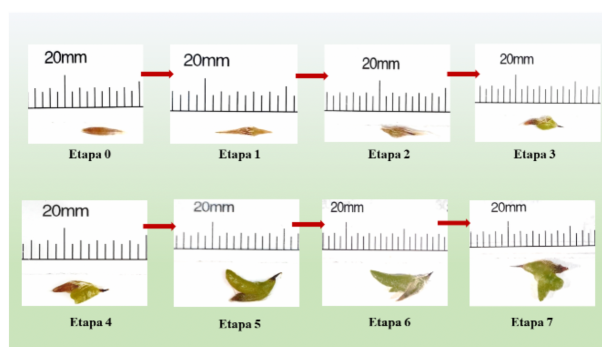


Figura 1. Etapas previas a la germinación, de la germinación y desarrollo vegetativo de *Tillandsia usneoides*.

Contaminación

La contaminación se presentó en dos tratamientos: T4 (nitrato de potasio 0.1 %) y T10 (chitosan 250 mg·litro⁻¹) (Figura 2), ambos tratamientos presentaron el 25 % de contaminación.

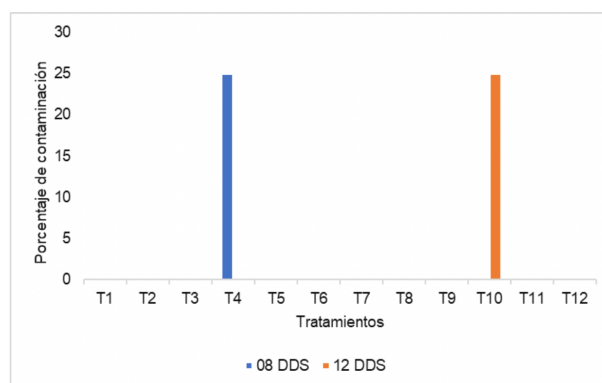


Figura 2. Contaminación observada durante 13 días con semillas de *Tillandsia usneoides* sometida a 12 tratamientos pregerminativos.

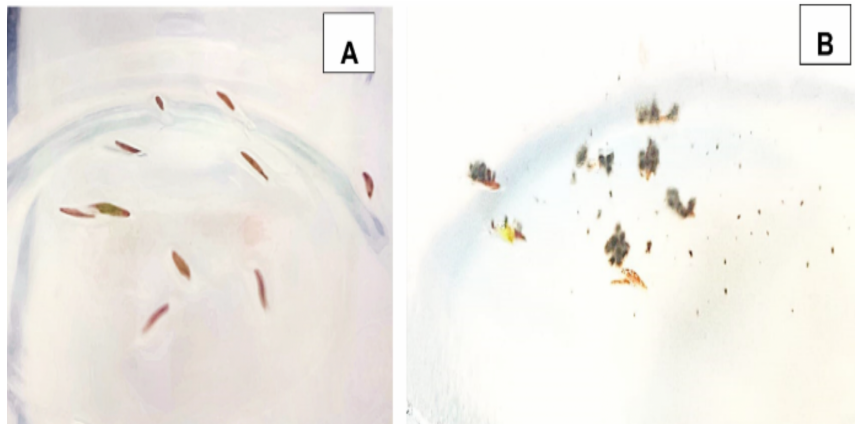


Figura 3. Presencia de bacteria (A) (NI*) y hongos (B) (NI*) en el T4. *No Identificado.

Aunque el quitosano es un fungicida a una dosis de 250 mg·litro⁻¹ se presentó contaminación. La contaminación fue por bacterias y hongos que se presentan en la Figura 3.

Germinación

Los resultados de germinación están representados en la Figura 4, donde los tratamientos T6 (giberelinas 50 mg·litro⁻¹) y T7 (giberelinas 150 mg·litro⁻¹) son los que tuvieron un mayor porcentaje de germinación (38 %), las giberelinas actúan como inductor de germinación en semillas en condiciones de dormancia (Peng y Harberd, 2002). Es importante mencionar que mediante un experimento se comprobó que los porcentajes de germinación de semillas de *M. exsucca* tratadas con esta ácido giberélico no superaron los valores obtenidos en el tratamiento de remojo en agua destilada, como tampoco aquellos obtenidos en el tratamiento control (Lasague *et al.*, 2010). Por su parte los porcentajes de germinación fueron más altos

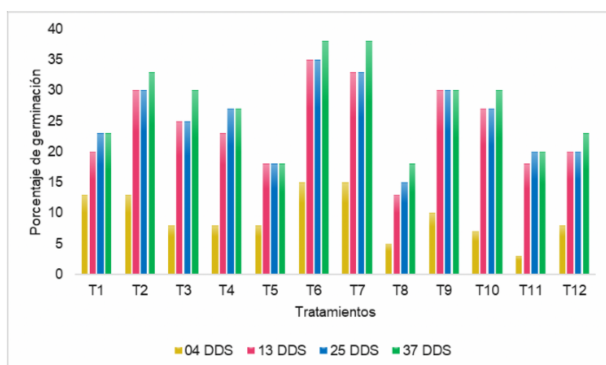


Figura 4. Evaluación del porcentaje de germinación en semillas de *Tillandsia usneoides* en un periodo de 38 días sometido a 12 tratamientos pregerminativos.

cuando se usó giberelinas (T6 y T7) que con el remojo durante una hora (T2) y el tratamiento a temperatura ambiente (T1).

Los tratamientos con menor porcentaje de germinación fueron T5 (nitrato de potasio 0.1 %) y T8



Figura 5. Semillas germinadas 38 días después de siembra (DDS) en semillas de *Tillandsia usneoides*, tratamiento T7.

(agua oxigenada 10 %), a esa concentración no fue favorable para tener un alto porcentaje de germinación.

Necrosis

El T2 (remojo una hora) fue el que presentó mayor porcentaje de necrosis, el tiempo de inmersión ejerció un efecto perjudicial en una gran cantidad de semillas (Figura 6). En el tratamiento T6 (giberelinas 50 mg·litro⁻¹) y T12 (2,4-D) presentaron 3 % de necrosis y en el resto de los tratamientos no presentó necrosis. El desarrollo de este problema está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado.

El fenómeno de necrosis ocurrió por el desbalance entre las reacciones pro-oxidación (excesiva formación de ROS (especie reactiva del oxígeno) y, o RNS (especie reactiva del nitrógeno) o de naturaleza enzimática) y los mecanismos antioxidantes para detoxificar (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Turrens, 2003).

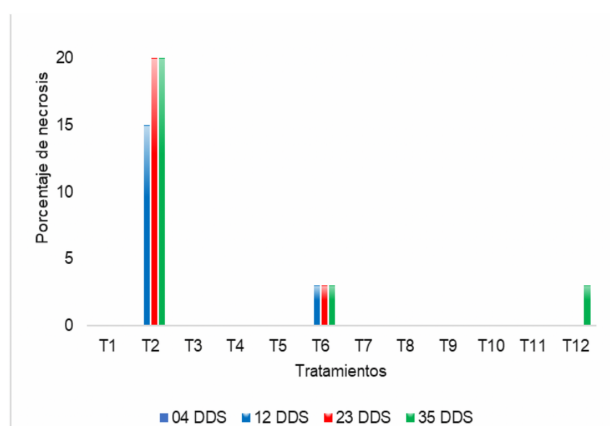


Figura 6. Porcentaje de necrosis en semillas de *Tillandsia usneoides* en un periodo de 36 días.

En el Cuadro 2 se presenta el análisis de varianza, $Pr > F = 0.7383$, siendo $\alpha \geq 0.05$ (5 %) por lo que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuadro 2. Análisis de varianza ($p \leq 0.05$) de semillas de *Tillandsia usneoides*.

F.V	G.L	S.C	C.M	F _{cal}	Pr > F
Tratamiento	3	498.222	166.074	0.42	0.7383
Error	30	11795.944	393.198		
Total	35	12422.889			

Plantas normales

Los tratamientos con mayor porcentaje de plantas normales fueron T4 (nitrato de potasio 0.1 %) y T10 (chitosan 250 mg·litro⁻¹), mientras que los tratamientos con menor número de plantas normales fueron los tratamientos T8 (agua oxigenada 10 %) y T11 (chitosan 500 mg·litro⁻¹). Debe señalarse que en los tratamientos T6 (giberelinas 50 mg·litro⁻¹) y T7 (giberelinas 150 mg·litro⁻¹) presentaron el mismo porcentaje de plantas normales. Resulta claro que luso de diferentes dosis de giberelinas no

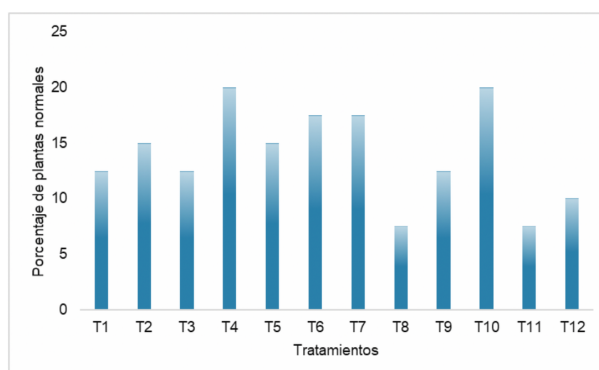


Figura 7. Cuantificación de plantas normales obtenidas en el experimento tres a los 38 DDS.

no tuvo gran influencia para obtener plantas normales.

Conclusiones

Los resultados indican que a una concentración de 50 mg·litro⁻¹ de giberelinas (T6) hay un aumento del 18% de germinación respecto al tratamiento con menor porcentaje T8 (agua oxigenada 10 %).

La contaminación se presentó solo en los tratamientos T4 (nitrato de potasio 0.1 %) y T10 (chitosan 250 mg·litro⁻¹) donde se presentó un 25 %, esos mismos tratamientos presentaron el mayor porcentaje de plantas normales.

El tratamiento con mayor porcentaje de necrosis fueron T2 (remojo 12 horas).

Se definió ocho etapas del proceso de germinación, a partir de la Etapa 2 ‘germinación’ se considera semilla germinada, desde la Etapa 3 empezó el desarrollo de plántula.

Literatura citada

- García-Granados B. I., Valdez-Hernández, E. F., Rodríguez-De La O, J. L., Juárez-Hernández, y M. De J., Flores-Cruz, M. (2023). Pregerminative treatments in *Tillandsia ionantha* seeds to obtain seedlings under *in vitro* culture. *Agro Productividad*: 147-153.
- Granados, M. C. (2005). *Estudio taxonómico del género Tillandsia L. (Bromeliaceae) en la Sierra Juárez (Oaxaca, México)*. Facultad de Ciencias de la UNAM.
- Latsague, V. M., Sáez, D.P. y Coronado, A.L. (2010). Tratamientos pregerminativos para *Myrcogenia exsucca* (Myrtaceae). *Bosque (Valdivia)*, 31(3), 243-246.
- Ludeña, V. J. C. (2012). Efecto de dos tratamientos pregerminativos en semillas de aliso (*Alnus acuminata*) y pino (*Pinus patula*), cantón riobamba, provincia de Chimborazo. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Miranda, J. M., Arellano, M.J., Salazar, A.B., Hernández, M.F., Quero, C.R. y Pérez, S.I. (2007). *Bases para el manejo comunitario de bromelias ornamentales*. En Estrada, A. M. (Ed.). Grupo Autónomo para la investigación ambiental A.C. México D.F.
- Peng, J. y Harberd, N.P. (2002). The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. *Curr Opin Plant Biology*, 5, 376-381.
- Silveira, D. G. (2009). Micropropagação e variabilidade genética de populações naturais de caroá [*Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez]. Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana. Brasil.
- Silveira, G. D., Duarte, S.F., Regina, P.C. Da Silva, S.A., Da Silva, L. y Ferreira, J.R. (2009). Micropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 923-932.
- Turrens, J. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552, 335-344.
- Véliz, P.M. (2010). Guía de Reconocimiento del Género *Tillandsia* de Guatemala. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.