

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y  
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**TESIS**

Morfogénesis *in vitro* de  
*Tillandsia imperialis* E. Morren ex  
Roezl (Bromeliaceae) mediante  
la inducción de  
brasinoesteroides y auxinas

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

SATHYA LAKSHMI ÁLVAREZ JARAMILLO

Directora

DRA. CLARA LUZ MICELI MÉNDEZ

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

Asesor

DR. MIGUEL ANGEL PERALTA MEIXUEIRO

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Agosto de 2024





# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

SECRETARÍA GENERAL

DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES

DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;

Fecha: 27 de agosto de 2024

C. **Sathya Lakshmi Álvarez Jaramillo**

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:  
*Morfogénesis in vitro* de *Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roezl (Bromeliaceae)

mediante la inducción de brasinoesteroides y auxinas

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

### Revisores

Mtra. Ana Guadalupe Rocha Loredo

Dra. Marisol Castro Moreno

Dra. Clara Luz Miceli Méndez

### Firmas:

Ccp. Expediente

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

En lo que atañe a la ejecución de este proyecto, preciso agradecer la experiencia de colaborar con la Dra. Clara Luz Miceli Méndez en esta línea de investigación bajo el sustento de su grata compañía; así también, la contribución a mi formación dedicada por los Biólogos Mario Alberto López Miceli y Alondra Elianeth Gutiérrez Calvo mediante su valiosa instrucción y guía; y de la misma manera, al gentil asesoramiento del Dr. Miguel Ángel Peralta Meixueiro.

En mi paso por la Licenciatura en Biología, me complace destacar la cautivadora dedicación que para la transmisión del conocimiento, imprimieron en mis apreciadas memorias los profesores que hoy me entusiasma distinguir:

A la autenticidad poética del Dr. Iván de la Cruz Chacón, con la que se especializa en conducir hacia el interés científico a través de maravillosas analogías.

A la emocionante introducción de mi primera clase universitaria celebrada por el Dr. José Antonio de Fuentes Vicente, quien además me compartió la invaluable experiencia de brindar mi servicio social en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular de la institución.

A la divertida ocurrencia que no se escapa del Dr. Felipe Ruan Soto al hablar de ciencia.

A la apasionante sumersión dentro del mundo de los artrópodos que, de manera particular, disfruto, aportada por el Dr. Gustavo Rivera Velázquez.

Al detallado compromiso dedicado a cada clase por la Maestra Ana Guadalupe Rocha Loredo, con quien compartí el aula en tres ocasiones y las salidas de campo más memorables; y además participó en la revisión de este proyecto.

A la habilidad de transferir la pasión por el conocimiento, de poner en marcha el pensamiento y estimular al razonamiento de la Dra. Marisol Castro Moreno; quien a su vez contribuyó a la revisión del presente trabajo.

A la entretenida didáctica empleada por el Maestro David Alberto Muñoz Zetina, tanto en el salón de clases como en el aula virtual.

A la libertad creativa concebida por el Biólogo Manuel Martínez Meléndez en el reflejo del aprendizaje, como a la fantástica perspectiva que entrega sobre las plantas con flores.

A la espléndida naturalidad de la Dra. Alma Gabriela Verdugo Valdéz para transformar la complejidad en claridad y simpleza, con su agilidad de llegar a la comprensión del fascinante nivel molecular.

Al interés demostrado por la Dra. María Adelina Schlie Guzmán en la procuración del aprendizaje a través de la adversidad.

La enseñanza empática y paciente que dedica el Dr. Sergio López Mendoza a sus clases, y su disposición de abrir las puertas de su campo a alumnos y exalumnos que anhelan ampliar su experiencia.

Por último, el enriquecimiento del periodo final de mi carrera por el Dr. Javier Gutiérrez Jiménez.

A mis amigos Ricardo Espino Gómez y Eduardo López Argueta, frutos de esta carrera, y a Bryan Gálvez Vázquez, que me acompaña antes de comenzarla, les estoy eternamente agradecida por reflejar una parte de su vida en la mía, animar mis días, apoyarme y enseñarme cosas para siempre valiosas.

A mi madre Teresa Concepción Jaramillo Villanueva y a mi padre José Luis Álvarez de la Vega, agradezco que en la formación de mi conciencia, me mostraron el camino correcto sembrando fuertes convicciones y principios que llevo profundamente adheridos a mi ser. Ante todo, nada de lo ofrecido es más valioso que la entrega por mantener mi motivación e impulsar mis sueños y metas.

A todos los amigos y familiares de cariño mutuo que difícilmente acabaría de mencionar, gracias por jugar un preciado papel en mi vida.

Dedico esta contribución a la eterna niña idealista que se sueña convertida en investigadora, para que jamás me abandone en el tiempo ni olvide su anhelo por el conocimiento; aquella que es gota en el océano de la suma conciencia divina experimentándose a sí misma.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VIII
RESUMEN .....	IX
ABSTRACT .....	X
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. FAMILIA BROMELIACEAE .....	4
2.2. <i>Tillandsia imperialis</i> .....	5
2.3. EL RITUAL DEL NIÑO FLORERO Y AMENAZA A LAS POBLACIONES DE <i>Tillandsia imperialis</i> EN LOS ALTOS DE CHIAPAS.....	6
2.4. CULTIVO <i>in vitro</i> DE TEJIDOS VEGETALES.....	10
2.4.1. Asepsia.....	10
2.4.2. Factores químicos .....	11
2.4.2.1. Composición del medio de cultivo.....	11
2.4.2.2. Macronutrientes .....	11
2.4.2.3. Micronutrientes.....	13
2.4.2.4. Carbohidratos.....	13
2.4.2.5. Reguladores de crecimiento.....	13
2.4.2.5.1. Reguladores de crecimiento clásicos: Auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abcísico y etileno .....	14
2.4.2.5.2. Brasinoesteroides.....	16
2.4.2.6. Vitaminas y aminoácidos.....	17
2.4.2.7. Quelatos.....	17
2.4.2.8. Agentes gelificantes .....	18
2.4.2.9. pH .....	18
2.4.3. Factores físicos.....	18
2.5 MICROPROPAGACIÓN .....	18
2.6 MORFOGÉNESIS VEGETAL.....	19
III. ANTECEDENTES .....	20
IV. OBJETIVOS.....	26

4.1. OBJETIVO GENERAL .....	26
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	26
V. HIPÓTESIS.....	26
VI. MÉTODO .....	27
7.5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	27
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	27
7.2. MEDIO DE CULTIVO .....	28
7.3. INCUBACIÓN.....	30
7.4. VARIABLES DE RESPUESTA.....	30
7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	31
VII. RESULTADOS.....	32
8.1. NÚMERO DE BROTES.....	32
8.2. NÚMERO DE RAÍCES .....	35
8.3. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA .....	36
8.4. LONGITUD TOTAL DE LA PLÁNTULA .....	42
8.5. BIOMASA.....	42
8.6. MORTALIDAD Y NECROSIS.....	43
VIII. DISCUSIÓN .....	44
9.1. NÚMERO DE BROTES.....	44
9.2. NÚMERO DE RAÍCES .....	46
9.3. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA .....	48
9.4. LONGITUD TOTAL DE LA PLÁNTULA .....	49
9.5. BIOMASA.....	51
9.6. MORTALIDAD Y NECROSIS.....	52
9.7. RAÍCES ADVENTICIAS CON TRICOMAS Y GRAVITROPISMO NEGATIVO .....	53
IX. CONCLUSIONES .....	56
X. RECOMENDACIONES.....	57
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	58
XII. ANEXOS.....	65

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Tillandsia imperialis</i> E. Morren ex Roezl (Royal Botanic Gardens, Kew, 2023; World Flora Online, 2024).....	6
Cuadro 2. Participación de los Floreros de 1995 a 2012 (Palacios-Gama, 2015).....	8
Cuadro 3. Macronutrientes (Perea, 2009) .....	12
Cuadro 4. Micronutrientes (Perea, 2009) .....	13
Cuadro 5. Tratamientos (T) para evaluar la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia imperialis</i> .....	27
Cuadro 6. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS; 1962) modificado de García-Ruíz (2011).....	29
Cuadro 7. Efecto de la interacción del brasinoesteroide brassinolide (BL) y de la auxina ácido naftalenacético (ANA) en la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia imperialis</i> .....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes del medio de cultivo .....	11
Figura 2. Ejemplares de <i>Tillandsia imperialis</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	28
Figura 3. Número de brotes en plántulas de <i>Tillandsia imperialis</i> por tratamiento .....	33
Figura 4. a) Brotes creciendo por encima de la base necrosada en T2; b) Brotes separados de plántula necrosada en T2 .....	33
Figura 5. Microbrotes: a), b) T3. c) T6.....	34
Figura 6. Plántulas obtenidas: a) T6, b) T8, c) y d) T9 .....	35
Figura 7. Número de raíces en plántulas de <i>Tillandsia imperialis</i> por tratamiento .....	36
Figura 8. Longitud de la raíz más larga (mm) en plántulas de <i>Tillandsia imperialis</i> por tratamiento .....	37
Figura 9. a) Base necrosada y desprendida en T4; b) individuo después de retirar la base necrosada.....	38
Figura 10. Plántulas con raíces adventicias engrosadas y cubiertas de tricomas: a, b, c, d, e, f) T4, g) T5, h, i) T7 j, k) T8 l) T9 .....	39
Figura 11. Ramificaciones del T9.....	40
Figura 12. Cúmulos de raíces: a), b) T5, c, d) T8, e, f, g, h) T9 .....	41
Figura 13. Estructuras nodulares y laminares: a, b, c, d, e, f) T7, g) T8, h, i) T9.....	41
Figura 14. Longitud total de las plántulas de <i>Tillandsia imperialis</i> (mm) por tratamiento .....	42
Figura 15. Biomasa (g) generada en las plántulas de <i>Tillandsia imperialis</i> por tratamiento .....	43

## RESUMEN

*Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roetzl (Bromeliaceae) es una planta epífita que habita bosques mesófilos de montaña y de pino-encino; se distribuye entre México, Guatemala, Honduras y El Salvador. En el estado de Chiapas, está sujeta a una sobre recolecta anual con objeto de ofrenda para la tradición del “Niño Florero”, en la cual, sus inflorescencias rojas son de interés. A este factor que pone en riesgo sus poblaciones se le suma la pérdida de hábitat por deforestación, comercialización, ciclo biológico largo y bajas tasas de germinación y supervivencia. Actualmente se encuentra bajo la categoría de “Amenazada” por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010). Por lo anterior, se emplean herramientas que permitan la conservación de la especie a largo plazo, entre las cuales se encuentra la propagación *in vitro*, que favorece la obtención de plantas en grandes cantidades, buena calidad y menor tiempo, posibilitando una posterior reintroducción al hábitat donde cumple sus funciones ecológicas. En la presente investigación, se evaluó la inducción de la morfogénesis *in vitro* de *T. imperialis* mediante dos hormonas vegetales: ácido naftalenacético (ANA) del grupo de las auxinas y brassinolide (BL) del grupo de los brasinoesteroides, con el objetivo de determinar su interacción en este proceso, así como identificar las concentraciones óptimas para lograr plantas mejor equipadas para la supervivencia *ex vitro*. Las variables evaluadas fueron: 1) número de brotes, 2) número de raíces, 3) longitud de la raíz más larga, 4) longitud total de la planta y 5) biomasa. La mayor producción de brotes se observó en ausencia de ANA siendo más alta mediante la concentración de 0.05 mg/L de BL sin diferencias significativas al tratamiento control; por otro lado, la interacción BL:ANA 0.25:1 mg/L promovió de manera óptima tanto la producción de raíces como el alargamiento de las mismas, así como el aumento de la longitud de las plántulas y en consecuencia, de la biomasa. Los resultados evidencian un efecto sinérgico entre brasinoesteroides y auxinas, promoviendo el crecimiento y la producción de biomasa con respecto a la altura total de la planta y la formación y crecimiento de las raíces de *T. imperialis*. Estos hallazgos contribuyen a la mejora de la propagación y cultivo *in vitro* de la especie, principalmente en la promoción del crecimiento de raíces, lo que permite un mejor crecimiento en menor tiempo.

**Palabras clave:** Alargamiento, auxinas, brasinoesteroides, Flor de *Niluyarilo*, rizogénesis.

## ABSTRACT

*Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roetzl (Bromeliaceae) is an epiphytic plant that inhabits mountain cloud forests and pine-oak forests; it is distributed in Mexico, Guatemala, Honduras and El Salvador. In the state of Chiapas, it is subject to annual overharvesting for the tradition of the “Niño Florero”, in which its red inflorescences are of interest. This factor, which puts its populations at risk, is compounded by habitat loss due to deforestation, commercialization, long biological cycle and low germination and survival rates. It is currently under “Threatened” category by the “Norma Oficial Mexicana” (Official Mexican Standard) (NOM-059-SEMARNAT-2010). Therefore, tools are employed to enable the long-term conservation of the species, among which is *in vitro* propagation, favoring the production of plants in large quantities, good quality and less time, enabling a subsequent reintroduction to the habitat where it fulfills its ecological functions. In this research, the *in vitro* morphogenesis induction of *T. imperialis* was evaluated using two plant hormones: naphthaleneacetic acid (NAA) from the auxin group and brassinolide (BL) from the brassinosteroid group, with the aim of determining their interaction in this process, as well as identifying optimal concentrations to achieve plants better equipped for *ex vitro* survival. The variables evaluated were: 1) number of shoots, 2) number of roots, 3) length of the longest root, 4) total length of the plant and 5) biomass. The highest production of shoots was observed in the absence of NAA, being higher through the concentration of 0.05 mg/L of BL with no significant differences to the control treatment; on the other hand, the interaction BL:NAA 0.25:1 mg/L optimally promoted both root production and root elongation, as well as increased seedling length and, consequently, biomass. The results demonstrate a synergistic effect between brassinosteroids and auxins, promoting growth and biomass production concerning the total height of the plant and the formation and growth of *T. imperialis* roots. These findings contribute to the improvement of *in vitro* propagation and cultivation of the species, primarily in promotion root growth, growth, enabling faster growth.

**Keywords:** Auxins, brassinosteroids, elongation, *Niluyarilo* flower, rhizogenesis.

# I. INTRODUCCIÓN

La familia de las bromeliáceas o bromelias (Bromeliaceae) tiene una distribución geográfica neotropical restringida al continente americano, con excepción de la especie *Pitcairnia feliciana* en el oeste de África (Ramírez-Morillo, 2010). A nivel mundial la familia está constituida por 56 géneros y unas 3 600 especies aceptadas (Versieux y Wendt, 2007; Gouda y Butcher, 2020). En México la familia Bromeliaceae engloba 19 géneros y 422 especies, siendo *Tillandsia* el género mejor representado con 230 especies, que constituyen el 54.5 % del total de la familia en el país (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018).

Particularmente, la especie *Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roezl, se distribuye entre México, Guatemala, Honduras y El Salvador (Global Biodiversity Information Facility, GBIF, 2021); mientras que en el país se ha registrado para los estados de Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Chiapas, donde en este último, es extraída intensamente cada año debido a su importancia cultural (Lee-Whiting, 2001; Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018).

*Tillandsia imperialis* habita bosques mesófilos de montaña y de pino-encino (Arredondo-Gómez *et al.*, 2012), en los cuales funge como refugio y hábitat de una comunidad ecológica asociada a ella que engloba una diversidad de invertebrados y pequeños vertebrados como anfibios y reptiles (Cruz-García *et al.*, 2010).

Así también, es una de las especies de *Tillandsia* empleadas en la tradición del Niño Florero, la cual se lleva a cabo del 14 al 25 de diciembre en los municipios de Chiapa de Corzo, Acala, Totolapa, Venustiano Carranza, Socoltenango, Chiapilla y San Lucas (Lee-Whiting, 2001; Palacios-Gama, 2017); la cual consiste en una serie de acciones religiosas en las que un grupo de hombres denominados “Floreros” realiza una peregrinación desde Chiapa de Corzo hacia Los Altos de Chiapas para cortar la denominada Flor de Niño o Flor de *Niluyarilo*, la cual corresponde a las plantas de *Tillandsia* que tienen inflorescencias rojas con las cuales elaboran ofrendas para los altares del Niño Florero en el día de su nacimiento, quien es una representación escultórica del Niño Dios (Lee-Whiting, 2001).

La velocidad de crecimiento de las bromeliáceas involucradas en la festividad del Niño Florero es baja, tardando de siete a nueve años para completar su ciclo biológico; también poseen bajas tasas de germinación y supervivencia, dificultando su establecimiento, por lo que su reproducción más común es asexual por medio de brotes. Además, el aumento de la deforestación local cada año ha ocasionado la pérdida y deterioro de su hábitat. En consecuencia, la disminución en la disponibilidad de las bromelias empleadas en dicha tradición, ha obligado a los Floreros a escalar localidades cada vez más lejanas para cortarlas (Lee-Whiting, 2001; Beutelspacher-Baigts y Farrera-Sarmiento, 2007; Palacios-Gama, 2015; Jiménez-Romero, 2016).

La sobre-recolecta para el uso tradicional, además de la comercialización en algunos sitios, más la pérdida y el deterioro de su hábitat y la lenta recuperación de estas especies dada por su largo ciclo biológico, son factores que han llevado a la inclusión de *T. imperialis* a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) en la categoría de Amenazada, por lo tanto, es necesario que se empleen herramientas que permitan el manejo y conservación de la especie en el largo plazo.

En este sentido, la propagación *in vitro* de plantas es una técnica que puede aplicarse como una de las etapas iniciales en la atención de medidas de rescate de poblaciones en peligro de extinción para reintroducirlas posteriormente a su hábitat (Jiménez-Romero, 2016); gracias a la obtención de plantas homogéneas en términos de cantidad, calidad y menor tiempo respecto a cómo se lograría bajo condiciones naturales, además de una completa sanidad vegetal, ayudando a superar barreras biológicas que cada especie enfrenta de manera particular para su geminación y establecimiento exitoso (Hernández-Sánchez, 2022).

Las hormonas vegetales o fitohormonas, son sustancias que regulan las fases del desarrollo vegetal (Luna-Duval, 2006), algunas de éstas son sintetizadas en el laboratorio para su empleo en cultivo *in vitro* de plantas y tejidos vegetales con el fin de producir determinadas respuestas en la diferenciación de órganos y tejidos, denominándose de manera general, reguladores de crecimiento (Perea, 2009).

La adición de reguladores de grupos de fitohormonas específicos a los medios de cultivo, al igual que la proporción y concentración de éstos, genera determinados

estímulos en la morfogénesis de las plantas que se cultiven, lo cual juega un rol fundamental en este contexto, ya que ciertos elementos de la morfogénesis *in vitro* son clave para lograr la efectividad de la aclimatación *ex vitro*, como la producción de raíces y el aumento en la altura de las plantas.

Los cinco grupos de fitohormonas o reguladores de crecimiento clásicos son las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Suárez-Padrón, 2020), pero existe además un sexto grupo que corresponde a los brasinoesteroides, el cual se encuentra en mínimas cantidades y en mayor concentración en los tejidos jóvenes en crecimiento, y es de vital importancia para el desarrollo de las plantas (Seeta *et al.*, 2002). Se ha documentado que varios de los procesos realizados por el grupo de los brasinoesteroides también son controlados por auxinas, lo que se sugiere que algunas vías morfogénéticas están reguladas por la interacción de estos dos grupos de hormonas (Halliday, 2004).

Pese a que ya se ha demostrado el potencial sinérgico de las auxinas y brasinoesteroides, su uso combinado no había sido reportado en el cultivo *in vitro* de bromeliáceas; por lo que la presente investigación pretende responder qué diferencias generará la suplementación de auxinas y brasinoesteroides en la morfogénesis *in vitro* de *T. imperialis* utilizando los reguladores de crecimiento ácido naftalenacético (ANA) y brassinolide (BL), pertenecientes a ambos grupos respectivamente; y de manera más específica, determinar la interacción de ambas hormonas estableciendo la concentración óptima en cada proceso morfogénético, correspondiente a la producción de brotes, formación y alargamiento de raíces y crecimiento de la plántula, además de evaluar la acumulación de biomasa.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. FAMILIA BROMELIACEAE

Las bromeliáceas o bromelias (Bromeliaceae) son plantas arrosetadas o raramente filamentosas; pueden ser terrestres o epífitas y tienen una alta reproducción asexual por medio de brotes secundarios, agrupándose para formar colonias o macollos como es el caso de la especie *Tillandsia imperialis*, que junto a la mayoría de bromelias del género, sólo florece una vez al final de su ciclo de vida (Ramírez-Morillo, 2010; Arredondo-Gómez *et al.*, 2012).

Son en su mayor parte plantas herbáceas de tallos cortos con metabolismo CAM; sus hojas son alternas, simples, rígidas, estrechas, paralelinervias, enteras o a menudo espinoso aserradas, formando una roseta basal, con entrenudos cortos y progresivamente más largos hacia la inflorescencia. La base de la hoja es envolvente en el tallo y se abre arriba en una lámina lanceolada, acanalada, que termina en un ápice muy agudo (Cabral *et al.*, 2010).

En diversas especies de algunos géneros, principalmente aquellas que habitan donde la precipitación sobrepasa los 1 000 mm, la sobreposición de las vainas foliares tiende a formar “depósitos o cisternas” que almacenan agua y materia orgánica que la planta absorbe a través de raíces adventicias nacidas de las bases foliares y de tricomas especializados; y que además, forman refugios que acumulan nutrientes de los cuales se benefician anfibios y reptiles, moluscos, platelmintos, anélidos, miriápodos, insectos, arácnidos, crustáceos, protozoos, e incluso varios polinizadores completan su ciclo aquí (Cabral *et al.*, 2010; Cruz-García *et al.*, 2010; Ramírez-Morillo, 2010; Aranda-Coello *et al.*, 2012).

En otras especies, las hojas se inflan para formar cámaras que las hormigas usan para establecer sus hormigueros, constituyendo una relación simbiótica mutualista denominada “mirmecofilia” (*myrme* = hormiga; *filia* = afinidad), en la cual, las hormigas proveen protección contra herbívoros a la planta (Ramírez-Morillo, 2010).

Sus flores son perfectas, dispuestas en inflorescencias terminales, pudiendo ser espigas, racimos o panículas, o ubicadas en las axilas de hojas. El perianto es

claramente diferenciado en un cáliz verdoso y una corola petaloidea vistosa, cada verticilo con 3 piezas. En las bromeliáceas *Aechmea*, *Vriesia* y *Tillandsia*, la inflorescencia completa funciona como unidad morfológica y ecológica de la polinización. Los sépalos y las brácteas tienen la función de atraer (semáfilos) y perduran más que los pétalos. Los frutos son en forma de baya o cápsula, aunque en los géneros *Ananas* y *Pseudoananas* la fruta se constituye de la fusión de los tejidos de los frutos individuales y del eje de la inflorescencia. Las semillas de las epífitas como *Tillandsia* son muy pequeñas de testa lisa o carnosa; se dispersan por el viento para establecerse en la copa de los árboles y tienen una baja tasa de germinación, con una supervivencia aún menor (Cabral *et al.*, 2010; Jiménez-Romero, 2016).

En México se las puede hallar en diversos tipos de vegetación. Las de vida epífita habitan principalmente en bosques mesófilos de montaña y bosques de encino (*Quercus*); y entre las de hábito terrestre, las del género *Hechtia* se encuentran preferentemente en matorrales xerófilos y bosques tropicales caducifolios, las del género *Greigia* en bosques mesófilos de montaña, mientras que la especie *Fosterella micrantha* habita bosques tropicales perennifolios y subcaducifolios y la especie *Pitcairnia punicea* es acuática (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018).

## **2.2. *Tillandsia imperialis***

El género *Tillandsia* constituye en cuanto a plantas, uno de los más representativos del mundo (Jiménez-Romero, 2016). De acuerdo con Espejo-Serna y López-Ferrari (2018), comprende 705 especies en total, de las cuales 230 están presentes en el territorio mexicano. Las especies de *Tillandsia* son enteramente epífitas. Presentan una densa cobertura de escamas peltadas cuya función principal es la absorción de agua proveniente del rocío de la noche y nutrientes de la atmósfera, y además, aumentar la reflexión de radiación solar de las hojas para disminuir la diferencia entre la temperatura foliar y el aire. Presentan raíces en el estado de plántula, que pasan a tener una función fijadora en la madurez (Cabral *et al.*, 2010).

La clasificación taxonómica de la especie *T. imperialis* se desglosa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roesl (Royal Botanic Gardens, Kew, 2023; World Flora Online, 2024)

Reino	Plantae
División	Streptophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Poales
Familia	Bromeliaceae
Género	<i>Tillandsia</i>
Especie	<i>Tillandsia imperialis</i>

*Tillandsia imperialis* crece en los bosques mesófilos de montaña y de pino-encino. Junto a la inflorescencia alcanza entre 35 a 45 cm de altura (Arredondo-Gómez *et al.*, 2012). La disposición arrositada de sus hojas permite la acumulación de agua, hojarasca y nutrientes que favorecen el crecimiento y desarrollo de diversos organismos interactuantes, formando microambientes que les proporcionan una temperatura estable, humedad, alimento, hábitat y protección contra depredadores. La fauna asociada se compone de moluscos, protozoos, platelmintos, anélidos, artrópodos y pequeños vertebrados como anfibios y reptiles (Cruz-García *et al.*, 2010).

### **2.3. EL RITUAL DEL NIÑO FLORERO Y AMENAZA A LAS POBLACIONES DE *Tillandsia imperialis* EN LOS ALTOS DE CHIAPAS**

El Niño Florero es la representación escultórica de un Niño Dios que reside en la ermita del patrón de los Floreros, en el barrio de Santa Elena, del municipio de Chiapa de Corzo. Dicha tradición pudo tener origen en la época prehispánica, ya que su distribución se limita tradicionalmente a los municipios de Chiapa de Corzo y Acala, poblados asentados dentro del antiguo dominio de la etnia chiapaneca, en los cuales este culto posee mucha importancia y antigüedad; posteriormente se unieron a la celebración otros pueblos dentro de la región cultural chiapaneca como el municipio de Totolapa, las localidades de Guerrero y Ricardo Flores Magón en el municipio de Venustiano Carranza, la localidad

de Nuevo San Sebastián la Candelaria en el municipio de Socoltenango, (Lee-Whiting, 2001) y los municipios de Chiapilla y San Lucas (Palacios-Gama, 2017).

El ritual consiste en una serie de acciones religiosas celebradas del 14 al 25 de diciembre, periodo durante el cual, un grupo de hombres denominados Floreros, realiza una peregrinación desde Chiapa de Corzo hasta los Altos de Chiapas, a una altura de entre 2 000 y 3 000 msnm. El punto de reunión es la montaña Santa Cecilia, reconocida por los chiapanecas como Montaña o Cerro de la Flor, al noroeste de la localidad de Navenchauc, en el municipio de Zinacantán. El objetivo es la búsqueda de la denominada Flor de *niluyarilo* (que en lengua chiapaneca se traduce como Flor de Niño), correspondiente a inflorescencias pertenecientes a bromelias del género *Tillandsia*, las cuales crecen sobre pinos y principalmente en encinos, donde se establecen con mayor facilidad (Lee-Whiting, 2001).

Se reportan cuatro especies de *Tillandsia* recolectadas por los floreros: 1) *T. imperialis* E. Morren ex Roetzl, o “mazorca”; 2) *T. guatemalensis* L. B. Smith “Flor de Niño”, “pluma” o “*indiyularilu*”; 3) *T. eizii* L. B. Smith, o “*nulirosa*” y 4) *T. usneoides* Linneo “heno”, o “pashte”, con flores verdosas poco conspicuas, utilizada ampliamente en los nacimientos católicos (Beutelspacher-Baigts y Farrera-Sarmiento, 2007).

Las inflorescencias de *Tillandsia*, de color rojo, son cargadas en mecapal por docenas, amarradas con cuerdas y adornadas con guirnaldas de tejocotes llamados localmente “manzanillas”, que corresponden a la especie *Crataegus nelsonii* Ettl. (Rosaceae) (Beutelspacher-Baigts y Farrera-Sarmiento, 2007). Estas decoraciones sirven para cubrir los altares de cada Florero, en especial el altar mayor de la iglesia de Santo Domingo en Chiapa de Corzo para la misa del 24 de diciembre, el cual contiene un hueco simulando la cuna del Niño Dios (Lee-Whiting, 2001).

El aumento en número de los Floreros aumentó con el pasar de los años en los diferentes pueblos, considerando datos desde 1969, en el que se registraron entre 40 y 70 Floreros de Chiapa de Corzo; al año 2000, que superó los 300 participantes. A su vez, la disponibilidad de plantas con inflorescencias que originalmente se encontraban en las laderas del Cerro de la Flor, ya comenzaba a verse mermada debido al comienzo de la deforestación local, obligando a los Floreros a viajar hacia las partes más altas del cerro

(Lee-Whiting, 2001). Para el año 2004 la cifra de participantes aumentó a 594 de acuerdo con Palacios-Gama, 2015 (Cuadro 2), la cual no ha sido superada de acuerdo con registros hechos hasta 2012 (son requeridos datos de los últimos años).

Cuadro 2. Participación de los Floreros de 1995 a 2012 (Palacios-Gama, 2015)

<b>Año</b>	<b>Floreros</b>	<b>Floreros novicios</b>	<b>Total</b>
1995	170	38	208
1996	182	74	256
1997	216	77	293
1998	243	113	356
1999	298	116	414
2000	365	104	469
2001	478	77	555
2002	518	74	592
2003	516	38	554
2004	526	68	594
2005	507	22	529
2006	475	40	515
2007	466	53	519
2008	504	30	534
2009	499	46	545
2010	514	77	591
2011	491	23	514
2012	486	68	554

Para la recolecta de las inflorescencias, los Floreros han tenido que pasar de los alrededores de Navenchuc hacia localidades más retiradas como Mitzitón y sus alrededores, llegando inclusive a los límites de los municipios de Teopisca y Huixtán (Beutelspacher-Baigts y Farrera-Sarmiento, 2007).

Debido a que los árboles maduros son capaces de albergar una mayor cantidad de bromelias, su antigüedad ha permitido por un largo tiempo la colonización de las mismas. Es por eso que entre los factores que ocasionan la disminución en las poblaciones de dichas epífitas, está la tala de los bosques con fines de uso maderero y comercialización de carbón; también cabe mencionar que las especies de *Tillandsia* se comercializan en el municipio de San Cristóbal de Las Casas (Aranda-Coello *et al.*, 2012; Ballinas-Aquino, 2022).

El ciclo de vida de las bromeliáceas, desde su germinación hasta la producción de inflorescencias, puede variar entre dos a 30 años según la especie. Para el caso de las especies de *Tillandsia* empleadas en la tradición del Niño Florero, este ciclo tarda entre siete y nueve años. Es oportuno señalar que las especies de bromeliáceas recolectadas para dicho ritual, a excepción de *T. eizii*, producen hijuelos o rebrotes, mediante los cuales las poblaciones podrían recuperarse parcialmente (Beutelspacher-Baigts y Farrera-Sarmiento, 2007; Jiménez-Romero, 2016), aunque de manera lenta, por lo que es necesario que se implementen medidas para su preservación.

*Tillandsia imperialis* se encuentra bajo la categoría de Amenazada en la Norma Oficial Mexicana-059 (SEMARNAT, 2010) junto con otras 15 especies del género. Se determina que las especies amenazadas están conformadas de poblaciones hiperdispersas con una densidad de población de un individuo cada cinco hectáreas o menor. Las especies amenazadas se hallan en riesgo de desaparecer a corto o mediano plazo si continúan los factores que contribuyen de manera negativa a la modificación de su respectivo hábitat, causando así su deterioro y la disminución del tamaño poblacional (Farrera-Sarmiento, 2013).

La lentitud con la que las poblaciones naturales pueden recuperarse, aunados a la colecta para uso tradicional y comercialización, más la deforestación de la zona, son factores de alarma para tomar distintas medidas que eviten la disminución de las poblaciones de las especies citadas y que vuelvan sustentable su aprovechamiento al mismo tiempo que se mantenga vigente la tradición.

La colecta de las bromelias para el Niño Florero ha llamado la atención de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), ante lo que los líderes de la tradición sostienen que sólo se obtiene un máximo de cinco flores por cada árbol. Además, ya se reconoce la preocupación por mantener el recurso natural disponible para conservar la tradición, por lo que se han recibido pláticas sobre el ciclo de vida y mejoras en el manejo de las especies de parte de Pronatura, con las que también se pretende concientizar la importancia de cuidar la fauna asociada a estas bromelias, comúnmente sacrificada por considerarse venenosa, como salamandras del género *Bolitoglossa* y lagartijas de la familia Anguidae, en especial *Mesaspis moreletii* y

*Abronia lythrochila*. También cabe mencionar que en 2020, la recolección de flores fue suspendida por primera vez debido a la pandemia de COVID-19 (Ballinas-Aquino, 2022).

Además de la generación de conciencia conservacionista entre los pobladores de mediante talleres de educación ambiental y la regulación del número de plantas recolectadas, se ha propuesto el establecimiento de áreas protegidas o de “no extracción” en diferentes sitios del bosque. Otra alternativa potencial para la conservación de las poblaciones de *Tillandsia*, es el cultivo en laboratorio de dichas especies y una subsecuente reintroducción en las ramas de los bosques de la zona de origen (Aranda-Coello *et al.*, 2012; Beutelspacher-Baigts y Farrera-Sarmiento, 2007).

## **2.4. CULTIVO *in vitro* DE TEJIDOS VEGETALES**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten cultivar células, tejidos y órganos vegetales en medios sintéticos dentro de frascos de vidrio; está caracterizado por la asepsia y el control de factores físicos y químicos que afectan al crecimiento. Los factores químicos corresponden a la composición del medio de cultivo y el pH; y los factores físicos son la temperatura, el fotoperiodo y la humedad (Castillo-Salle, 2004; Morales-Rubio *et al.*, 2016).

### **2.4.1. Asepsia**

El medio de cultivo debe esterilizarse por medio de calor húmedo en autoclave cuando se trata de medios sólidos; los medios líquidos, para cultivos de células en suspensión, son inestables a altas temperaturas y se esterilizan mediante ultrafiltración. De igual manera, la parte de la planta a utilizar (explante), debe desinfectarse superficialmente con soluciones como: hipoclorito de sodio o de calcio, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio, etanol, plata coloidal, detergentes no iónicos, fungicidas, antibióticos entre otras. La siembra del explante o de la plántula en el medio de cultivo y los posteriores subcultivos, se realizan usualmente bajo una campana de flujo laminar. El alcohol entre otros químicos, se utilizan para esterilizar el área e instrumentos de trabajo (Morales-Rubio *et al.*, 2016; Singh y Kumar, 2020).

## 2.4.2. Factores químicos

### 2.4.2.1. Composición del medio de cultivo

Los medios de cultivo vegetales están compuestos principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, otros compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento, una fuente de carbono y un agente gelificante en el caso de los medios de cultivo sólidos (Figura 1). El medio Murashige y Skoog (MS; 1962) es el más usado para la propagación vegetativa *in vitro* de muchas especies de plantas (Morales-Rubio *et al.*, 2016)



Figura 1. Componentes del medio de cultivo

### 2.4.2.2. Macronutrientes

Los seis elementos mayores: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S) conforman los macronutrientes requeridos para el crecimiento estructural adecuado de las plantas (Cuadro 3; Perea, 2009).

Cuadro 3. Macronutrientes (Perea, 2009)

Elemento	
N	<p>-Constitutivo de las biomoléculas.</p> <p>-Generalmente se suministra en forma de nitrato (<math>\text{NO}_3^-</math>) o de amonio (<math>\text{NH}_4^+</math>).</p> <p>-Es importante regular la dosis, ya que en algunas especies su exceso puede causar la vitrificación de las plántulas.</p>
P	<p>-Indispensable en la fotosíntesis y la respiración celular.</p> <p>-Forma parte de la molécula de ATP (adenosintrifosfato).</p> <p>-Estructural en muchas moléculas y células, como en los enlaces diéster de los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos fundamentales de las membranas.</p>
K	<p>-Abundante en las vacuolas.</p> <p>-Participa en la apertura y cierre estomático.</p> <p>-Interviene en la osmorregulación.</p> <p>-Activa sistemas enzimáticos (oxidoreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetisas y quinasas).</p>
Ca	<p>-Estimula el desarrollo de raíces y hojas.</p> <p>-Forma compuestos de las paredes celulares.</p> <p>-Activa e inhibe enzimas en el citosol de las células.</p>
Mg	<p>-Se encuentra principalmente en los cloroplastos y un 20% en las moléculas de clorofila.</p> <p>-Participa en la activación de moléculas como rubisco, fosfoenolpiruvato carboxilasa y glutamato sintasa.</p>
S	<p>-Forma parte estructural de la cisteína, aminoácido indispensable en el metabolismo del S.</p> <p>-Forma grupos sulfidrilo (SH), esenciales para la actividad catalítica de varias enzimas.</p>

### 2.4.2.3. Micronutrientes

Se requieren en baja concentración para el crecimiento de las plantas, los más utilizados son hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B) y molibdeno (Mo) (cuadro 4) (Perea, 2009).

Cuadro 4. Micronutrientes (Perea, 2009)

Elemento	Función
Fe	-Forma parte de los grupos catalíticos de muchas enzimas redox. -Se encuentra unido a grupos tiólicos de la cisteína en proteínas claves de la fotosíntesis. -Se requiere en mayor cantidad.
Mn	-Forma el complejo manganeso-proteína que transporta electrones al fotosistema II y activa enzimas respiratorias del ciclo de Krebs.
Zn	-Se concentra en la raíz, algunas enzimas lo contienen e interviene en la síntesis y la conservación de auxinas.
Cu	-Interviene en numerosos procesos de oxidación-reducción.
B	-Facilita el transporte de los azúcares a través de la pared celular -Está involucrado en la división y crecimiento celular, la germinación y regulación hormonal.
Mo	-Forma parte de la enzima nitrato reductasa, que reduce nitratos a nitritos para su asimilación.

### 2.4.2.4. Carbohidratos

Los monosacáridos y disacáridos son las fuentes de carbono más importantes de los cultivos *in vitro*. El azúcar más utilizado es la sacarosa, la cual es hidrolizada extracelularmente a glucosa por las plantas para transformarla en energía (Perea, 2009).

### 2.4.2.5. Reguladores de crecimiento

El primer cultivo *in vitro* de tejidos vegetales fue obra del botánico alemán Gottlieb Haberlandt, quien estableció células aisladas de tejidos foliares de parénquima en empalizada en medios de cultivo con glucosa. Aunque sólo observó un aumento de

volumen celular, reconoció la falta de requerimientos nutricionales para inducir la división y multiplicación de estas, además de que había utilizado tejido altamente diferenciado, y postuló a principios del siglo XX que las plantas son capaces de generar individuos completos a partir de células aisladas, originando la hipótesis de la totipotencia celular. Sin embargo, no tenía manera de probarlo, ya que no se habían descubierto la mayoría de los componentes que integran los medios de cultivo actuales y que influyen en el crecimiento y diferenciación celular. Fue hasta la década de los cincuenta, con el descubrimiento de las hormonas vegetales, cuando se reconoció la importancia del balance hormonal en las plantas (Castillo-Salle, 2004; Suárez-Padrón, 2020).

Las hormonas vegetales o fitohormonas, son sustancias químicas encargadas de regular las fases del desarrollo vegetal, ya sea inhibiendo o promoviendo el crecimiento y diferenciación de las células vegetales en los diferentes órganos de la planta. Las fitohormonas se sintetizan en determinadas partes de la planta y luego son transportadas al órgano o sitio en el que ejercerán sus efectos reguladores (Lluna-Duval, 2006). Las fitohormonas son reguladores de crecimiento, no obstante este último término generaliza tanto a las sustancias de origen natural (fitohormonas) como a las sintetizadas en laboratorio (análogos), que determinan respuestas en la planta (Perea, 2009).

El tipo y concentración de reguladores de crecimiento que se adicione a los medios de cultivo dependerá de la especie vegetal y del tejido u órgano a cultivar, así como de los objetivos de la investigación. Altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces, mientras que altas concentraciones de citocininas promueven la regeneración de brotes; por otra parte, el balance entre las concentraciones de auxina y citocinina inducen el desarrollo de una masa desdiferenciada de células llamada callo (Morales-Rubio *et al.*, 2016).

#### **2.4.2.5.1. Reguladores de crecimiento clásicos: Auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno**

A continuación se describen los cinco grupos de fitohormonas o reguladores de crecimiento clásicos (Suárez-Padrón, 2020).

- Auxinas

Estimulan la dominancia apical, el crecimiento y la división celular, el desarrollo meristemático, la inducción de raíces adventicias y la formación de embriones somáticos. De forma natural se produce el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB), los cuales se sintetizan en los ápices foliares desde donde se desplazan a la zona radical. Entre los compuestos análogos sintetizados en el laboratorio, están el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y el picloram. El AIB y el ANA son los más utilizados en la micropropagación de meristemas y organogénesis; mientras que el 2,4-D y el picloram, de mayor efecto, se utilizan en la inducción de tejidos embriogénicos; y el AIA se utiliza menos por su facilidad de degradación enzimática.

- Citocininas

Interrumpen la dominancia apical, actúan en la división celular, desarrollo de yemas axilares y retardo de la senescencia de las hojas. Se sintetizan en los ápices radicales desde donde se transportan a las yemas apicales y axilares. Naturalmente, la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP) son sintetizadas por la planta, mientras que de manera sintética se encuentran la 6-bencilaminopurina (BAP), la kinetina (KIN) y el thidiazuron 15 (TDZ), entre los cuales BAP es la más utilizada para el cultivo *in vitro*, especialmente en la multiplicación de meristemas preexistentes y organogénesis.

- Giberelinas

Promueven el alargamiento de los entrenudos mediante división y elongación celular. Se sintetiza principalmente en hojas jóvenes. La giberelina más utilizada en el cultivo *in vitro* es el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) con el objetivo de promover la elongación de tallos micropropagados y la conversión de embriones somáticos en plantas. Sin embargo no es conveniente para la multiplicación de brotes y emisión de raíces, ya que se ha observado un efecto inhibitorio. Se recomienda que al utilizarse se emplee la esterilización por filtración, debido a que el calor altera su estructura.

- Ácido abscísico

Controla la apertura y cierre de estomas, inhibe la elongación y división celular, promueve cierto grado de abscisión foliar e induce la dormancia de las semillas. Se origina en las raíces y hojas adultas, desde donde se desplaza a sus sitios de acción. En el cultivo *in*

*in vitro* inhibe la formación de callos e induce la maduración de embriones somáticos y la formación de órganos de almacenamiento y dormancia como cormos y microtubérculos.

- Etileno

Es un gas sintetizado a partir del aminoácido metionina y se produce en la mayoría de los tejidos. Induce la senescencia y la abscisión de hojas y flores, la formación de raíces adventicias y elimina la dormancia de semillas y yemas. En condiciones *in vitro* es poco favorable y debe evitarse su acumulación.

#### **2.4.2.5.2. Brasinoesteroides**

Los brasinoesteroides son compuestos polihidroxifenólicos que se encuentran en mínimas cantidades (a nivel de nano gramos) en el polen, hojas, yemas, flores y semillas, en proporciones y formas diferentes. Los tejidos jóvenes en crecimiento contienen niveles más altos que los tejidos maduros, siendo el polen y las semillas inmaduras las fuentes más ricas con un rango de 1-100 ng/g en peso fresco, mientras que los brotes y las hojas usualmente tienen menores cantidades, *i.e.* 0.01-0.1 ng/g de peso fresco. Son considerados el sexto grupo de fitohormonas de acuerdo a su vital importancia para el desarrollo de las plantas. Se han aislado y caracterizado decenas de compuestos con diferentes grados de actividad estimuladora, como la catasterona (CS) y el brassinolide (BL), siendo este último el representante más activo, y el primero en ser aislado a partir del polen de *Brassica napus* en 1979. Actualmente se conocen alrededor de 60 estructuras (Seeta *et al.*, 2002; Salgado-Garciglia *et al.*, 2008; Perea, 2009).

Debido a la baja concentración de brasinoesteroides disponible en las plantas, para estudios biológicos se han sintetizado análogos que ejercen efectos cualitativamente similares a los naturales. Los brasinoesteroides y sus análogos han demostrado su capacidad para estimular la expansión y división celular, induciendo procesos de germinación, rizogénesis, elongación de tallos, floración, crecimiento de tubos polínicos y maduración; tienen influencia en el doblamiento de hojas y epinastia, inhibición de raíces, senescencia, abscisión de las hojas, gravitropismo, inducción de biosíntesis de etileno, activación de la bomba de protones, diferenciación del xilema y regulación de expresión de genes. También conceden resistencia ante el estrés abiótico

como la salinidad, sequía, cambios bruscos de temperatura y agentes químicos como plaguicidas y herbicidas; y al estrés biótico producido por plagas (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008).

Se ha probado que los brasinoesteroides controlan procesos que a su vez son regulados por auxinas, lo que sugiere que algunas de estas vías se llevan a cabo bajo la interacción de estos dos grupos de hormonas (Halliday, 2004); también se ha documentado que los brasinoesteroides interactúan en forma sinérgica con las giberelinas, y se reporta que pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citocininas en otro (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008).

De acuerdo a diversos estudios, brasinoesteroides y auxinas participan sinérgicamente en múltiples procesos de desarrollo de las plantas, incluidos la elongación del hipocótilo, el desarrollo de haces vasculares y de raíces, tropismos, entre otros. Además, el sinergismo entre auxinas y brasinoesteroides involucran numerosos procesos que comparten genes diana a nivel molecular. Algunos estudios fisiológicos han demostrado que cuando los brasinoesteroides se usan en conjunto con auxinas, potencian sus efectos (Tian *et al.*, 2018; Pacholczak *et al.*, 2021).

#### **2.4.2.6. Vitaminas y aminoácidos**

Las vitaminas cumplen funciones catalizadoras durante las reacciones enzimáticas. La tiamina o vitamina B1 es la más utilizada, puesto que forma parte de la coenzima tiamina pirofosfato, que convierte el ácido pirúvico en acetil coenzima A en el ciclo de Krebs. El ácido nicotínico es una vitamina importante de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido y de la síntesis del ADN. La piridoxina o vitamina B6 convierte las moléculas alimenticias en energía y participa en los procesos respiratorios. El ácido pantoténico forma parte de la coenzima A. La biotina transporta CO<sub>2</sub>. El ácido fólico transporta unidades mono-carbonadas. El myo-inositol o meso-inositol suele unirse al grupo fosfato de los fosfolípidos de las membranas celulares (Perea, 2009).

#### **2.4.2.7. Quelatos**

Los iones metálicos se encuentran en soluciones hidratadas, es decir, rodeados por moléculas de agua, cuando estas moléculas de agua son reemplazadas por un agente

quelante, se forma una estructura en anillo, a esto se le llama quelatación, y resulta en un compuesto con propiedades químicas distintas a las del metal original. La quelatación de elementos es empleada para la nutrición vegetal debido a que favorece la asimilación del elemento por la planta y evita que las dosis grandes de elementos sean fitotóxicas, así como su precipitación en el medio extracelular. Los elementos Ca y Mg no requieren de la quelatación para su absorción, sin embargo, altas concentraciones de los elementos Zn, Cu, Fe y Mn son menos fitotóxicas bajo la forma de quelatos que cuando se encuentran como sales simples. Los agentes quelantes como los ácidos glucónico, cítrico, tartárico y málico parecen ser los más indicados para la nutrición vegetal debido a su estabilidad (Walco, 1997).

#### **2.4.2.8. Agentes gelificantes**

Es necesario el uso de un compuesto que gelifique el medio para proveer soporte a la planta; los más conocidos son agar-agar y phytigel o gelrite (Perea, 2009).

#### **2.4.2.9. pH**

El pH influye tanto al crecimiento de las plantas como a la actividad de los reguladores de crecimiento, por lo que debe regularse a valores entre 5.4 y 5.8 (Morales-Rubio *et al.*, 2016).

#### **2.4.3. Factores físicos**

El material vegetal debe mantenerse en cuartos de incubación, los cuales mantienen un control de temperatura, fotoperiodo, intensidad lumínica y humedad. El nivel adecuado de estos factores físicos dependerá de la especie y del objetivo de la investigación. Por lo regular, las plantas se mantienen en un ambiente con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y temperatura constante, la cual es óptima entre los 25 y 28°C (Perea, 2009).

### **2.5 MICROPROPAGACIÓN**

La micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones del cultivo *in vitro*, la cual ofrece un método alternativo de propagación vegetativa masiva en un periodo de tiempo corto, mediante la producción de clones que pueden almacenarse en espacios

pequeños a partir de cantidades mínimas de material vegetal o explantes de una planta madre (Castillo-Salle, 2004; Aryal, 2022).

Esta técnica representa una alternativa para aquellas especies caracterizadas por una limitada propagación vegetativa y/o una viabilidad y número de semillas escaso, permitiendo su regeneración en un lapso menor al de su ciclo de vida silvestre y posibilitando una posterior reintroducción a su hábitat, de tal manera que puede funcionar como una de las etapas iniciales en el rescate de poblaciones en peligro de extinción. De este modo, la importancia de la micropropagación radica en la protección y el aseguramiento de la subsistencia de especies comprometidas por la explotación de sus recursos (Jiménez-Romero, 2016; Morales-Rubio *et al.*, 2016).

## **2.6 MORFOGÉNESIS VEGETAL**

La morfogénesis vegetal se refiere a los cambios graduales y sucesivos que experimenta una planta a nivel celular, tisular y organogénico, que mediante procesos de crecimiento y diferenciación, dan lugar a la formación de los caracteres morfológicos que estructuran al organismo (Segura, 2013).

La diferenciación comienza desde el nivel celular, e implica la expresión de genes específicos controlada por señales físicas del ambiente como la luz y la gravedad, y señales químicas como la interacción de fitohormonas y/o nutrientes. Por su parte, las fitohormonas se ligan a un receptor proteico presente en las células de un órgano específico, actuando sobre el promotor de una secuencia génica y provocando su expresión (Montaldi, 1992).

La ruta organogénica produce la formación de los órganos vegetales como raíces, tallos, brotes y hojas. La plasticidad de las células vegetales, también conocida como totipotencia celular, les da la capacidad de desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo, por lo que la organogénesis puede ocurrir de manera indirecta en el cultivo *in vitro*; esto es, si la respuesta al estímulo morfogénico implica la desdiferenciación de las células para formar una masa llamada callo de manera previa a la diferenciación de los tejidos meristemáticos, que son los responsables del crecimiento (Gisbert-Doménech, 2010).

### III. ANTECEDENTES

Pocos trabajos se han realizado sobre cultivo *in vitro* de especies de bromelias empleando inductores de crecimiento como las auxinas, citocininas y giberelinas; por otro lado, los brasinoesteroides sólo se han empleado de manera *ex vitro* en sustratos de invernadero para algunos géneros de bromelias que no incluyen a *Tillandsia*, como se detalla a continuación.

Droste *et al.* (2005) germinaron semillas de *Vriesea gigantea* y *V. philippocoburgii* en tres medios de Knudson (KND) adicionados con distintas concentraciones de macronutrientes y composiciones vitamínicas durante 45 días; posteriormente transfirieron las plántulas a tratamientos para la inducción de brotes adventicios empleando las mismas variantes de medio KND y adicionados uniformemente con 2.0 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) + 0.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) durante cuatro meses. Los medios empleados no generaron variaciones significativas en el número de brotes, pero sí hubo diferencias estadísticas para los resultados obtenidos entre ambas especies, donde *V. gigantea* y *V. philippocoburgii*, considerando los tres tratamientos de KND, mostraron un promedio de 0.72 y 4.3 brotes por plántula respectivamente. *V. gigantea* produjo un promedio entre 40 y 68% de brotes adventicios, mientras que todas las plántulas de *V. philippocoburgii* los generaron, los cuales se transfirieron a 0.2 mg/L de ANA por seis meses hasta su aclimatización, donde continuó su proliferación y a los tres meses se produjeron raíces y brotes apicales.

Pickens *et al.* (2006) indujeron yemas adventicias a partir de semillas y plántulas de *T. eizii* cultivadas en medio KND modificado durante tres tiempos (cero, tres y 12 semanas). Primero se transfirieron a un medio de inducción de yemas (KND + 1.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP) por 30 días, sin embargo estos tiempos no produjeron diferencias estadísticamente significativas, aunque los cultivos de 12 semanas generaron la mayor cantidad de yemas por explante y desarrollaron brotes más frondosos en comparación con la exposición continua de los de tres semanas -que formaron callos y yemas con brotes más pequeños-, y los de cero semanas -que limitaron su crecimiento, presentando clorosis y oscurecimiento-. Después se realizó una inducción con 4 tratamientos de BAP y ANA, de entre los cuales, 2.0 mg/L BAP + 0.1

mg/L ANA generó un porcentaje significativamente mayor (40%) de cultivos con yemas. Los niveles más altos de BAP y más bajos de ANA generaron más yemas.

Aragão-Catunda *et al.* (2008) evaluaron el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones del análogo de brasinoesteroide BIOBRAS-16 (0.0, 0.1, 0.3, 0.5 y 1.0 mg/L) y dos tipos de sustratos (Plantmax® y una mezcla de compostaje de bagazo de caña de azúcar + torta de filtración) en la aclimatación de plántulas micropropagadas de *Ananas comosus*. Las plantas cultivadas en sustrato de bagazo de caña de azúcar + sustrato de torta de filtración y asperjadas con 0.1 mg/L de BIOBRAS-16 mostraron un mayor crecimiento en número de hojas, diámetro de roseta, ancho de hoja y producción de materia fresca y seca a los 150 días de la siembra.

Capote *et al.* (2009) evaluaron el efecto del análogo de brasinoesteroide MH5 en la aclimatización de brotes de un híbrido de *Vriesea* utilizando cuatro tratamientos (0.0, 0.01, 0.05 y 0.1 mg/L). Para ello, seleccionaron brotes de *Vriesea* previamente cultivados en medio Murashige y Skoog (MS) modificado, y los colocaron sobre un sustrato con una mezcla de zeolita más fibra de coco en una proporción (1:1, v:v) en bandejas dentro de una cámara de crecimiento con condiciones de humedad controladas; aplicaron polvo enraizador con ácido indolbutírico (AIB) a una concentración de 492.12  $\mu\text{mol/mol}$ . Los tratamientos con MH5 mostraron la mayor supervivencia y estimularon la formación de raíces, el número de hojas y masa fresca de los brotes, lo que sugiere un probable efecto sinérgico entre brasinoesteroide y auxina, siendo este el único reporte encontrado sobre la interacción de ambos grupos de reguladores de crecimiento en una bromeliácea adicionados de manera *ex vitro*.

Lopes-da-Silva *et al.* (2009) germinaron semillas de *V. scalaris* durante 10 días; posteriormente se indujo la formación de brotes en medios MS adicionados con 0.0, 0.1, 0.2, 0.4 y 1.0 mg/L de BAP o kinetina (KIN), mostrando BAP una regresión lineal positiva y logrando una multiplicación máxima de 8.0 brotes en promedio mediante 1.0 mg/L de BAP a los 120 días de cultivo, en contraste con KIN, que sólo produjo un máximo de 2.0 brotes en promedio sin diferencias significativas entre las concentraciones empleadas; también probaron el enraizamiento de los brotes en medio MS a la mitad de concentración con tratamientos de 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L de AIB a los 45 días de cultivo,

los cuales mostraron una regresión cuadrática negativa, resultando el mejor enraizamiento del 40% en ausencia de AIB; y por último cultivaron explantes de hojas de las plántulas obtenidas para inducción de brotes en medios con 0.01 mg/L de BAP + 1.0 mg/L de ANA, obteniendo al igual que con las plántulas germinadas, alrededor de 8.0 brotes en promedio por explante.

Dal-Vesco y Guerra (2010) realizaron un protocolo regenerativo basado en la inducción y desarrollo de cultivos nodulares (CN) en *V. reitzii* para la propagación de microbrotes. La mayor eficiencia regenerativa de los CN a las 10 semanas de cultivo fue de 12.4 g/g y se obtuvo en medio de cultivo líquido MS suplementado con 0.37 mg/L de ANA + 0.4 mg/L de 2-isopentenil adenina (2-iP), dando como resultado un promedio de 708.7 microbrotes regenerados, un número estimado de 5,329 microbrotes/g de CN y una masa fresca de 1.781 g. Después de 21 semanas en este medio, se observó una intensa y sincrónica proliferación de microbrotes con longitud de 3 a 5 mm, los cuales se subcultivaron en tratamientos de medio MS adicionados con 0.0, 1.73, 3.46 y 5.2 mg/L de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), resultando el de 3.46 mg/L de AG<sub>3</sub> el más efectivo para aumentar el alargamiento sincronizado de los microbrotes a las 10 semanas de cultivo con un promedio de 12 mm. Por el contrario, en cuanto a la eficiencia regenerativa de brotes, los tratamientos de AG<sub>3</sub> mostraron una regresión cuadrática negativa, mientras que los medios sin AG<sub>3</sub> continuaron la proliferación de estos.

Pinto *et al.* (2013) evaluaron el efecto de BAP solo o en combinación con ANA en el desarrollo de brotes de plántulas de *T. gardneri* establecidas en medio MS durante 24 semanas, obteniendo un máximo de 1.92 brotes en promedio con 2.0 mg/L de BAP; mientras que esta misma concentración adicionada con ANA, produjo oscurecimiento en todas las plántulas bajo la cantidad de 0.5 mg/L, además de callos y mortalidad en el 50% de las plántulas con la dosis de 1.0 mg/L.

Freitas *et al.* (2014) evaluaron el efecto de dosis del brasinoesteroide BIOBRAS16® (0.5, 0.7, 1.0 mg/L) sobre yemas axilares de secciones de tallo de piña (*A. comosus*), las cuales fueron sumergidas durante 5 min en las soluciones correspondientes a los tratamientos de brasinoesteroides y posteriormente se sembraron en maceteros con arena esterilizada; las dosis se aplicaron nuevamente a los 30 y 60

días mediante aspersores manuales. El tratamiento con la dosis más alta (1.0 mg/L) obtuvo el mayor promedio de yemas brotadas por tramo, proporcionando un incremento de 41.9% con relación al control, así como el mayor aumento en longitud, diámetro, número de hojas, peso fresco y peso seco de las partes aéreas de los brotes emitidos a los 120 días.

Ferrara-de-Resende *et al.* (2016) germinaron semillas de *V. cacuminis*, a partir de las cuales obtuvieron explantes para su multiplicación en medio MS suplementado con 0.0, 1.1, 2.2 y 3.3 mg/L de BAP o 0.0, 1.7, 3.3 y 5.2 mg/L de AG<sub>3</sub> + 0, 0.3, 0.5 o 0.8 mg/L de ANA por 90 días. Los tratamientos de AG<sub>3</sub> + ANA mostraron el mayor número de raíces (2.3 en promedio) en 5.2 mg/L de AG<sub>3</sub> + 0.3 mg/L de ANA; mientras que los tratamientos de BAP + ANA generaron el mayor número de brotes (9.3 en promedio) mediante 3.3 mg/L de BAP + 0.8 mg/L de ANA. También probaron el enraizamiento en medios MS que contenían BAP o AG<sub>3</sub> + 0.0, 0.02, 0.03, 0.05 y 0.07 mg/L de ANA o de ácido indol-3-acético (AIA), o 0, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 mg/L de AIB por 90 días, donde ANA en combinación de AG<sub>3</sub> produjo el mayor número de raíces, de 2.0 a 2.3 en promedio en las concentraciones de 0.02, 0.03 y 0.05 mg/L de AG<sub>3</sub>, en comparación con las otras auxinas, mientras que los explantes en AG<sub>3</sub> generaron las raíces estadísticamente más largas de 0.14 a 0.15 mm en respuesta a 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/L de ANA, 0.02 mg/L de AIA y 0.08 de AIB.

Jiménez-Romero (2016) evaluó el efecto de BAP en medios MS para la inducción de brotes *in vitro* de *T. imperialis* mediante la aplicación de tres tratamientos (0.5, 1.0, 1.5 mg/L de BAP) durante 60 días, tomando como variables de respuesta el número de hojas, la longitud de las hojas, el número de brotes y la biomasa adquirida. La dosis de 0.5 mg/L produjo un mayor incremento sobre el total de las variables medidas.

Castañeda-Ramírez (2017) evaluó medios de cultivo MS suplementados con dosis de BAP y ANA para su efecto en explantes foliares (3.3 mg/L BAP y 5.0 mg/L BAP + 0.50 mg/L ANA), yemas axilares y meristemos apicales (1.8 mg/L ANA y 1.0 mg/L BAP) de *Neoregelia caroliniae*; analizando las variables de altura y número de hojas para los medios de meristemos apicales, ya que fueron los únicos que produjeron respuesta, y concluyendo que ambos medios evaluados fueron igual de efectivos sin presentar

diferencias significativas a los 28 días del establecimiento de los meristemos apicales; y llevaron a cabo la multiplicación de estos en medio MS suplementado con 1.8 mg/L de ANA + 2.0 mg/L de AIB + 2 mg/L de KIN durante 35 días, obteniendo la formación de un brote en la mitad de los explantes.

Hernández-Meneses *et al.* (2018) indujeron la formación de brotes en explantes de *V. heliconioides* suplementados con BAP (1.1, 2.2 y 3.3 mg/L) y ANA (0.2 y 0.3 mg/L), resultando la combinación más óptima en cuanto a número de brotes la del medio adicionado con 2.2 mg/L de BAP y 0.2 mg/L de ANA, misma que establecieron para la multiplicación de los brotes y por último, indujeron el alargamiento y enraizamiento de plantas en medios MS completos y a la mitad de concentración de sales, con y sin 0.3 mg/L de AG<sub>3</sub>, obteniendo un mayor número de raíces en medios a la mitad de concentración, con o sin AG<sub>3</sub>, mientras que los brotes que crecieron en el medio completo adicionado con 0.3 mg/L de AG<sub>3</sub> mostraron un alargamiento significativamente mayor que el de los cultivados sin AG<sub>3</sub>.

Márquez-Martínez (2019) evaluó la morfogénesis *in vitro* de *T. viridiflora* mediante el efecto de diversos estímulos hormonales en cada etapa: la germinación *in vitro* de semillas mediante el empleo de tratamientos con BAP (0.5, 1.0, 2.0 mg/L) y ANA (0.1, 0.2, 0.4 mg/L); la inducción de brotes mediante dosis de BAP (0.5, 0.7, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0 mg/L) y una dosis de ANA (0.1 mg/L); la multiplicación de brotes mediante dosis de BAP (0.5, 0.7, 1.0, 1.2, 1.5 mg/L) y una de ANA (0.1 mg/L); el alargamiento de brotes mediante dosis de AG<sub>3</sub> (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L); y el enraizamiento con las concentraciones de 0.2 y 0.4 mg/L tanto de ANA como de AIB. La mejor inducción de brotes se logró con 1.5 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA; la mayor multiplicación se obtuvo con 1.0 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA; el mayor alargamiento con 2.0 mg/L de AG<sub>3</sub> y el mayor número de raíces se consiguió con 2.0 mg/L de ANA.

Ördögh (2022) evaluó cambios morfológicos inducidos en *V. splendens* después de tres meses en cultivos de medio MS, adicionados en tratamientos por separado con las citocininas BAP, ribósido de 6-benciladenina (RBAP), KIN y meta-topolina (MT); y las auxinas ANA y AIB; cada regulador en las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/L. El mayor número de brotes, con un promedio de 25.75, se obtuvo con la concentración

de 0.8 mg/L de BAP, seguido de 0.4 mg/L de BAP con 21.78 en promedio; además, las citocininas BAPR y MT, también mostraron un aumento en la producción de brotes, en contraste con KIN y las auxinas. Por su parte, ANA fue más eficiente en el enraizamiento y en el alargamiento de las raíces; generando una producción máxima de 7.58 raíces en promedio con 0.2 mg/L, y 26.88 mm en promedio con la concentración de 0.8 mg/L. La mayor eficiencia en elevar la altura de las plantas y el peso fresco también se alcanzó con ANA, obteniendo un máximo de 35.56 mm en promedio a la concentración de 0.2 mg/L, y de 1.13 g a 0.8 mg/L.

De acuerdo a los reportes anteriores, las auxinas han sido ampliamente utilizadas en la morfogénesis *in vitro* de bromelias; no así para los brasinoesteroides, que sólo se han empleado para la aclimatación; mientras que para la especie *T. imperialis* no se ha reportado el uso de ambos reguladores por separado ni en conjunto.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar los efectos de la suplementación de brasinoesteroides y auxinas en la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia imperialis*.

### **4.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Describir los efectos de la interacción de brassinolide (BL) y ácido naftalenacético (ANA) sobre la morfogénesis directa e indirecta *in vitro* de *Tillandsia imperialis*.
- Identificar la concentración óptima de brassinolide (BL) y ácido naftalenacético (ANA) en cada etapa de la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia imperialis*.

## **V. HIPÓTESIS**

La adición de un brasinoesteroide y una auxina en el medio de cultivo *in vitro* inducirán cambios y efectos sinérgicos en la morfogénesis directa e indirecta de plántulas de *Tillandsia imperialis*.

## VI. MÉTODO

### 7.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un arreglo factorial de 3 x 3, correspondiendo el único factor a los reguladores de crecimiento: el brasinoesteroide brassinolide (BL) de la marca Brassinal® ((22R,23R)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-Tetrahidroxi-7 $\alpha$ -homo7-oxa-5 $\alpha$ -campestan-6-ona 2,3,22,23- Tetrahidroxi- $\beta$ -homo-7-oxaergostan-6-ona) y la auxina ácido naftalenacético (ANA); cada uno con tres concentraciones, dando un total de nueve tratamientos experimentales incluyendo al de control (Cuadro 5). Se realizaron 20 repeticiones por tratamiento, dando lugar a un total de 180 unidades experimentales, referentes a una plántula por frasco.

Cuadro 5. Tratamientos (T) para evaluar la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia imperialis*

		ANA (mg/L)		
		0.0	0.5	1.0
BL (mg/L)	0.0	T1	T4	T7
	0.05	T2	T5	T8
	0.25	T3	T6	T9

### 7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material vegetal proviene de individuos de *T. imperialis* cultivados *in vitro* en el Jardín Botánico Faustino Miranda, los cuales fueron donados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH, donde se desarrollaron líneas clonales de cada ejemplar, subcultivadas de manera aleatoria en medios Murashigue y Skoog (MS) (Figura 2). Para el experimento, se seleccionaron plántulas sin raíces de 15 a 20 mm de longitud.



Figura 2. Ejemplares de *Tillandsia imperialis* cultivados *in vitro*

## 7.2. MEDIO DE CULTIVO

- Se preparó medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) modificado de García-Ruíz (2011) (Cuadro 6) empleando 500 ml de agua destilada, 100 ml de macroelementos, 10 ml de microelementos, 10 ml de quelatos y se pesaron 30 g de azúcar comercial, lo cual fue depositado en un matraz aforado de 1 000 ml.
- Se midió el pH con un potenciómetro Hanna®, ajustándolo a  $5.6 \pm 0.1$  mediante una solución de hidróxido de sodio (NaOH) o de ácido clorhídrico (HCl) a 1.0 N según se necesitara; enseguida se pesaron y se agregaron 2.5 g de Phytigel®, manteniendo una agitación constante en una parrilla de agitación electromagnética Nuova® hasta un minuto de iniciar el proceso de ebullición.
- Posteriormente, se midieron 500 ml del medio de cultivo con ayuda de un matraz aforado y se agregaron las diferentes concentraciones de BL y ANA hasta completar ocho tratamientos experimentales y un testigo libre de reguladores (Cuadro 6).
- Enseguida, se colocaron 25 ml de medio de cultivo en frascos de cristal con capacidad de 125 ml para cada unidad experimental, los cuales fueron tapados y sellados con

película plástica autoadherible Azt Ega Pack® y esterilizados a 103.421 kPa durante 15 minutos en un autoclave Ecoshel®.

- Una vez esterilizados, los frascos fueron colocados en un cuarto de incubación a 25° C durante 72 horas para prueba de esterilidad.
- Posteriormente, al azar se llevó a cabo el subcultivo de las plántulas en la campana de flujo laminar, asegurando condiciones de asepsia.

Cuadro 6. Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS; 1962) modificado de García-Ruíz (2011)

Componentes	Fórmula	Nombre común	Cantidad
Macroelementos (10 X)	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Nitrato de amonio	16.5 g
	$\text{KNO}_3$	Nitrato de potasio	19.0 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio dihidratado	4.4 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	3.7 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de potasio monobásico	1.7 g
Microelementos (100 X)	KI	Yoduro de potasio	83 mg
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	Ácido bórico	620 mg
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de manganeso tetrahidratado	1690 mg
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinc heptahidratado	860 mg

	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de sodio dihidratado	25 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	2.5 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de cobalto hexahidratado	2.5 mg
Quelatos (100 X)	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	EDTA sal disódica dihidratada	4.123 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato ferroso heptahidratado	2.780 g

### 7.3. INCUBACIÓN

Posterior al subcultivo de las plántulas dentro de los frascos de los tratamientos, se mantuvieron en un cuarto de incubación a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$ , con una intensidad lumínica de 1 800 lux y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/obscuridad durante un periodo de 90 días.

### 7.4. VARIABLES DE RESPUESTA

Una vez finalizada la etapa de cultivo *in vitro* se midieron las siguientes variables:

1. Número de brotes: Cada nuevo conjunto de hojas emergido de la base del tallo, los cuales fueron separados para su contabilización.
2. Número de raíces: Número total de raíces emergidas contabilizadas; principales y/o adventicias y necrosadas y/o vivas.
3. Longitud de la raíz más larga: Medida en milímetros (mm) de la raíz más larga de cada plántula, tomada con un vernier.
4. Longitud total de la plántula: Medida de la longitud total de la plántula en mm de la base hasta la parte superior de las hojas, tomada con un vernier.
5. Biomasa: Peso fresco de cada plántula en gramos (g) tomado con ayuda de una balanza analítica.

## 7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro Wilk ( $p < 0.05$ ) para la totalidad de los datos obtenidos, los cuales rechazaron el supuesto, por lo que fueron transformados mediante la fórmula  $\sqrt{X+1}$  para realizar una segunda prueba de normalidad. En función de los resultados de la segunda prueba de normalidad, se procedió a realizar una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) y una prueba de Dunn's post hoc en el caso de los datos que no superaron el supuesto de normalidad (correspondientes a las variables número de brotes y número de raíces); mientras que para los datos de las variables que superaron el supuesto se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y Tukey's pairwise con un nivel de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Past4.08. Por su parte, las gráficas de caja fueron realizadas mediante el programa estadístico Statplus7.8 para la comparación de promedios y medianas de las mediciones reales.

## VII. RESULTADOS

### 8.1. NÚMERO DE BROTES

De acuerdo al análisis de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los tratamientos (T) ( $p=2.681E-05$ ) (Anexo 2), alcanzándose el mayor promedio de 13.61 brotes por plántula en el T2, seguido del T1 (control) con 9.14 brotes, y del T3 con 9.05 brotes (Cuadro 7, Figura 4). La prueba de Dunn's post hoc mostró la similitud entre los tratamientos anteriores, diferenciándose totalmente del T4, T5, T7 y T9 (Anexo 3).

Cuadro 7. Efecto de la interacción del brasinoesteroide brassinolide (BL) y de la auxina ácido naftalenacético (ANA) en la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia imperialis*

Tratamientos	BL/ANA (mg/L)	Número de brotes	Número de raíces	Longitud de la raíz más larga (mm)	Longitud total de la plántula (mm)	Biomasa (g)
T1 (control)	0.0/0.0	9.14 ± 4.55	1.5 ± 0.75	4.98 ± 3.02	20.07 ± 1.94	0.53 ± 0.18
T2	0.05/0.0	13.61 ± 8.98	1.72 ± 0.78	9.28 ± 5.59	22.33 ± 3.44	0.71 ± 0.19
T3	0.25/0.0	9.05 ± 5.26	1.72 ± 0.90	8.21 ± 5.07	25.77 ± 4.01	0.75 ± 0.20
T4	0.0/0.5	4.33 ± 5.04	7.17 ± 3.37	10.66 ± 4.54	31.32 ± 7.53	0.83 ± 0.32
T5	0.05/0.5	2.0 ± 1.77	8.35 ± 3.72	11.58 ± 3.56	31.65 ± 8.01	0.60 ± 0.18
T6	0.25/0.5	6.4 ± 4.88	7.61 ± 4.18	8.94 ± 3.68	30.24 ± 7.30	0.70 ± 0.23
T7	0.0/1.0	3.16 ± 2.71	11.0 ± 5.67	13.05 ± 4.63	29.91 ± 6.89	0.79 ± 0.26
T8	0.05/1.0	5.14 ± 5.30	12.62 ± 6.82	9.85 ± 4.00	30.89 ± 9.01	0.95 ± 0.53
T9	0.25/1.0	3.0 ± 2.73	13.2 ± 4.92	14.85 ± 5.14	34.03 ± 3.40	1.25 ± 0.24

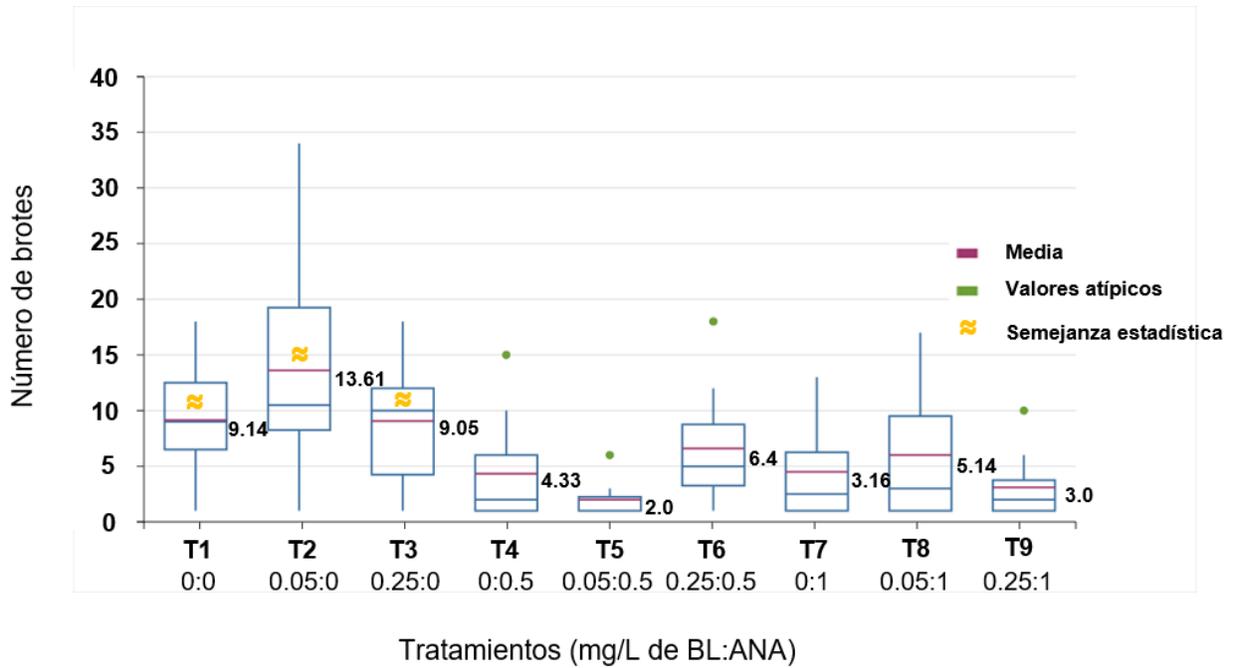


Figura 3. Número de brotes en plántulas de *Tillandsia imperialis* por tratamiento

Algunos de los individuos presentaron necrosis en la parte basal y un crecimiento escaso o nulo, en contraste con sus numerosos brotes (Figura 5).

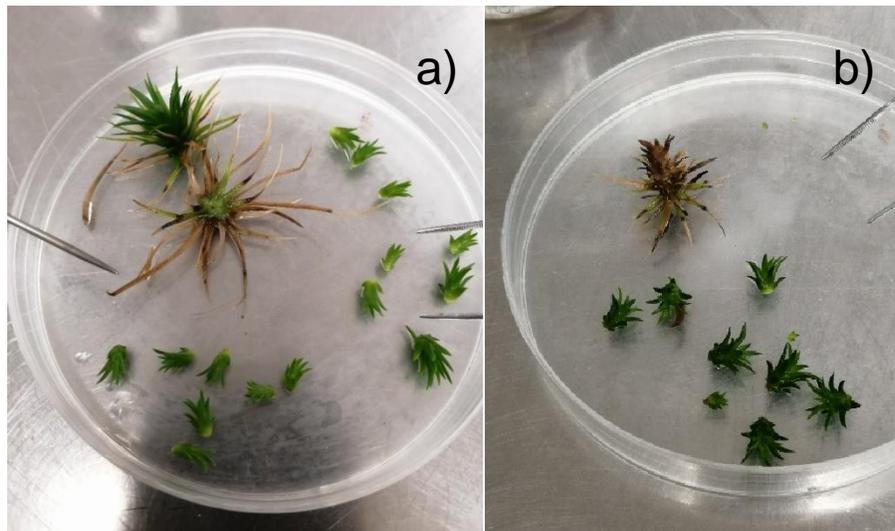


Figura 4. a) Brotes creciendo por encima de la base necrosada en T2; b) Brotes separados de plántula necrosada en T2

También se observó la formación inusual de microbrotes sobre hojas en dos individuos de dos tratamientos: en el T3 se desarrollaron sobre hojas apicales (Figura 6 a y b); y en el T6 sobre una de las hojas (Figura 6c).

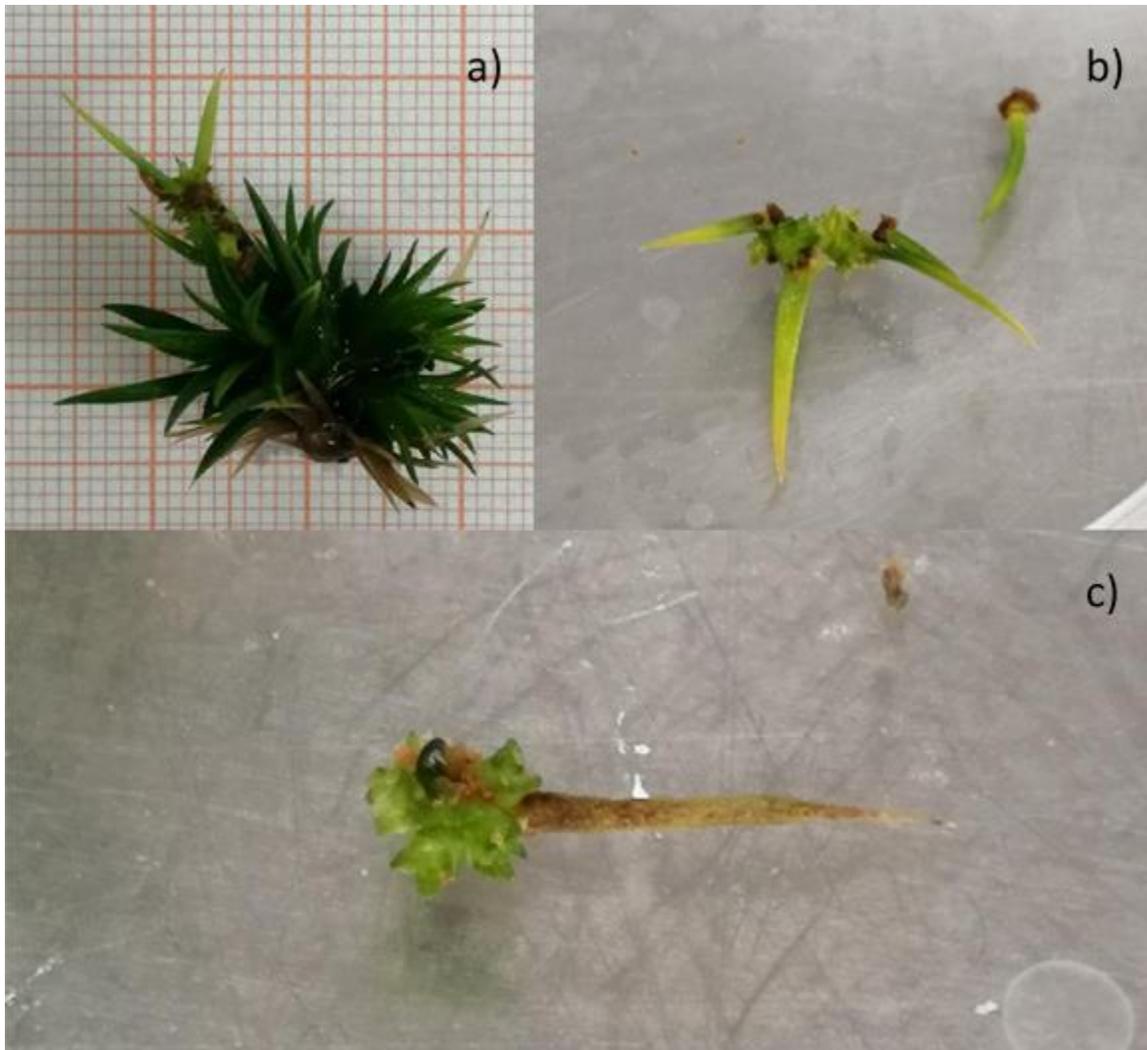


Figura 5. Microbrotes: a), b) T3. c) T6

Individuos del T6, T7, T8 y T9 (Figura 7) generaron por tratamiento un total de dos, ocho, seis y nueve brotes enraizados respectivamente, por lo que no fueron contabilizados dentro de esta variable, debido a que la presencia de raíces indica la conversión de los brotes en nuevas plántulas independientes.

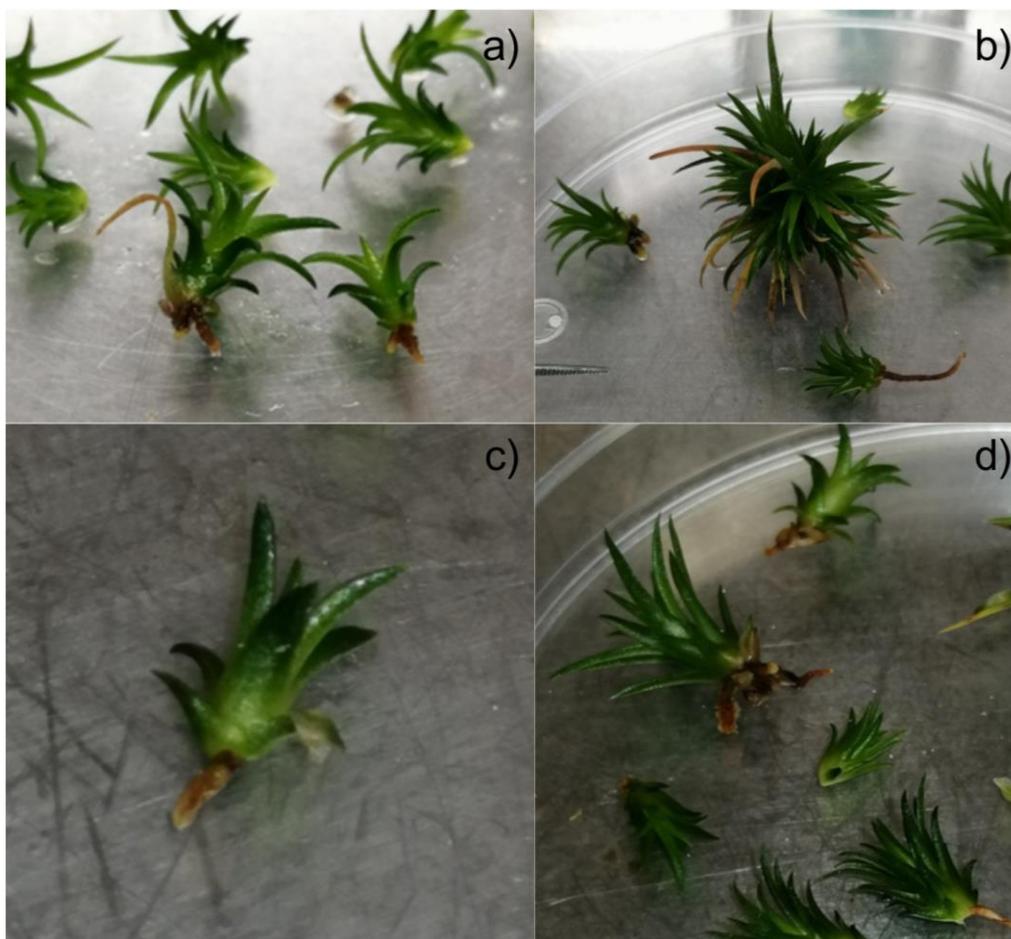


Figura 6. Plántulas obtenidas: a) T6, b) T8, c) y d) T9

## 8.2. NÚMERO DE RAÍCES

Las diferencias entre las medianas se hallaron estadísticamente significativas en función del análisis de Kruskal-Wallis ( $p=2.306E-12$ ) (Anexo 5), ubicándose el promedio más elevado en el T9 (13.2), seguido del T8 (12.62) y T7 (11) (Cuadro 7, Figura 8). La prueba de Dunn's post hoc indicó semejanza entre dichos tratamientos y mayor diferencia entre el T9 y el resto de tratamientos (Anexo 6).

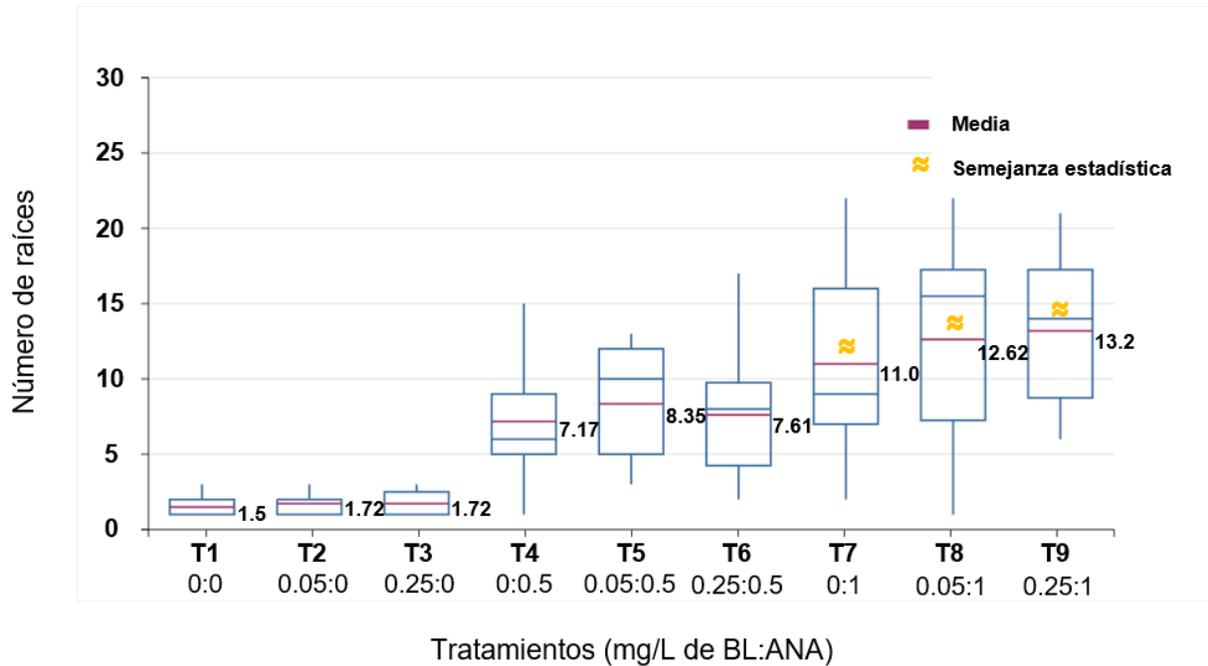


Figura 7. Número de raíces en plántulas de *Tillandsia imperialis* por tratamiento

### 8.3. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA

El análisis de ANOVA señaló diferencias estadísticamente significativas entre las medianas ( $p=3.591E-06$ ) (Anexo 8), ubicando al promedio más alto en el T9 (14.85 mm), seguido del T7 (13.05 mm) y T5 (11.58 mm) (Cuadro 7, Figura 9). La prueba de Tukey's pairwise mostró las diferencias significativas entre el T9 respecto al control, el T2, T3, y T6; mientras que T4, T5 y T7 mostraron diferencias sólo respecto al control (Anexo 9).

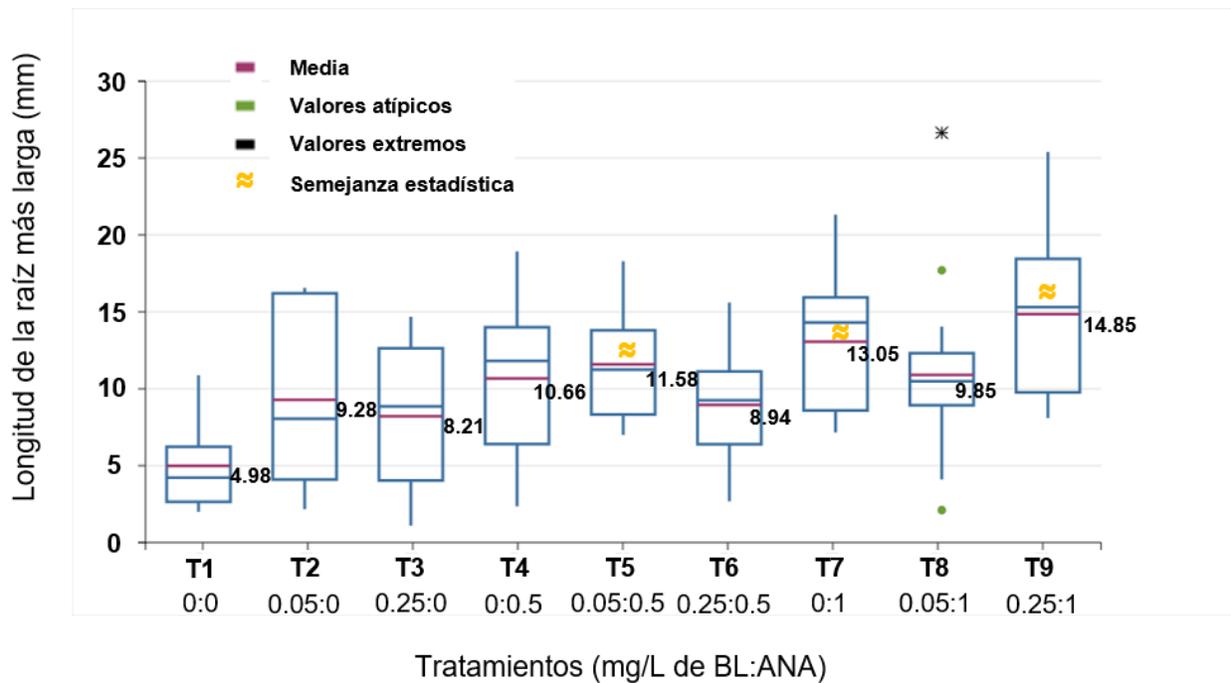


Figura 8. Longitud de la raíz más larga (mm) en plántulas de *Tillandsia imperialis* por tratamiento

La necrosis en la base de las plántulas, así como el desprendimiento de las mismas, fue frecuente en los individuos del T4 al T9 (Figura 10). Además se observó la formación de raíces engrosadas recubiertas de tricomas, las cuales se situaron inmediatamente arriba de las bases necrosadas desprendidas, algunas de las cuales presentaron una coloración amarillo-verdosa en sus partes terminales (Figura 11). El T9 se destacó en cuanto a la morfología particular de sus raíces adventicias y tricomas (Figura 12).

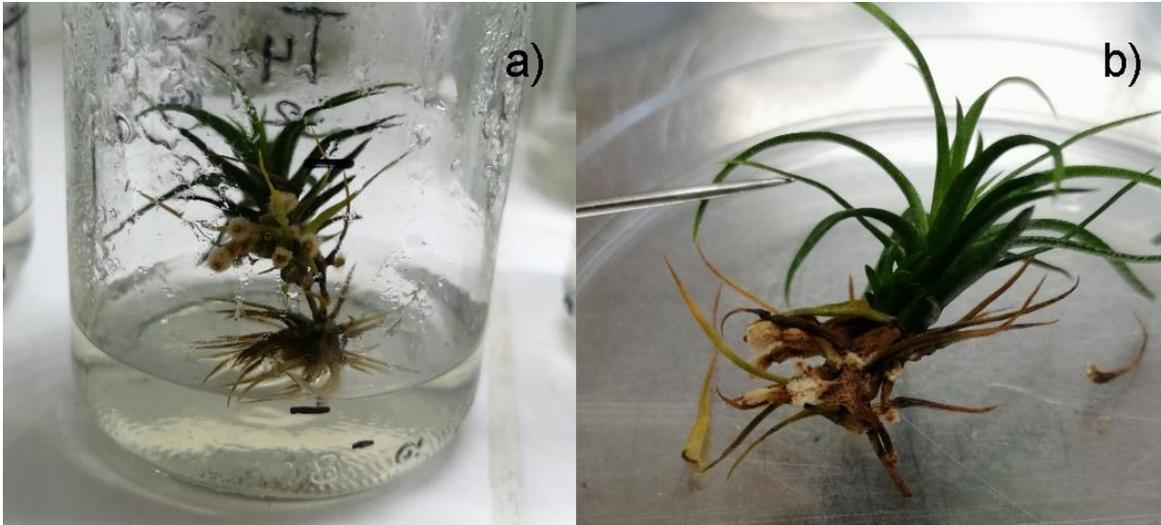


Figura 9. a) Base necrosada y desprendida en T4; b) individuo después de retirar la base necrosada

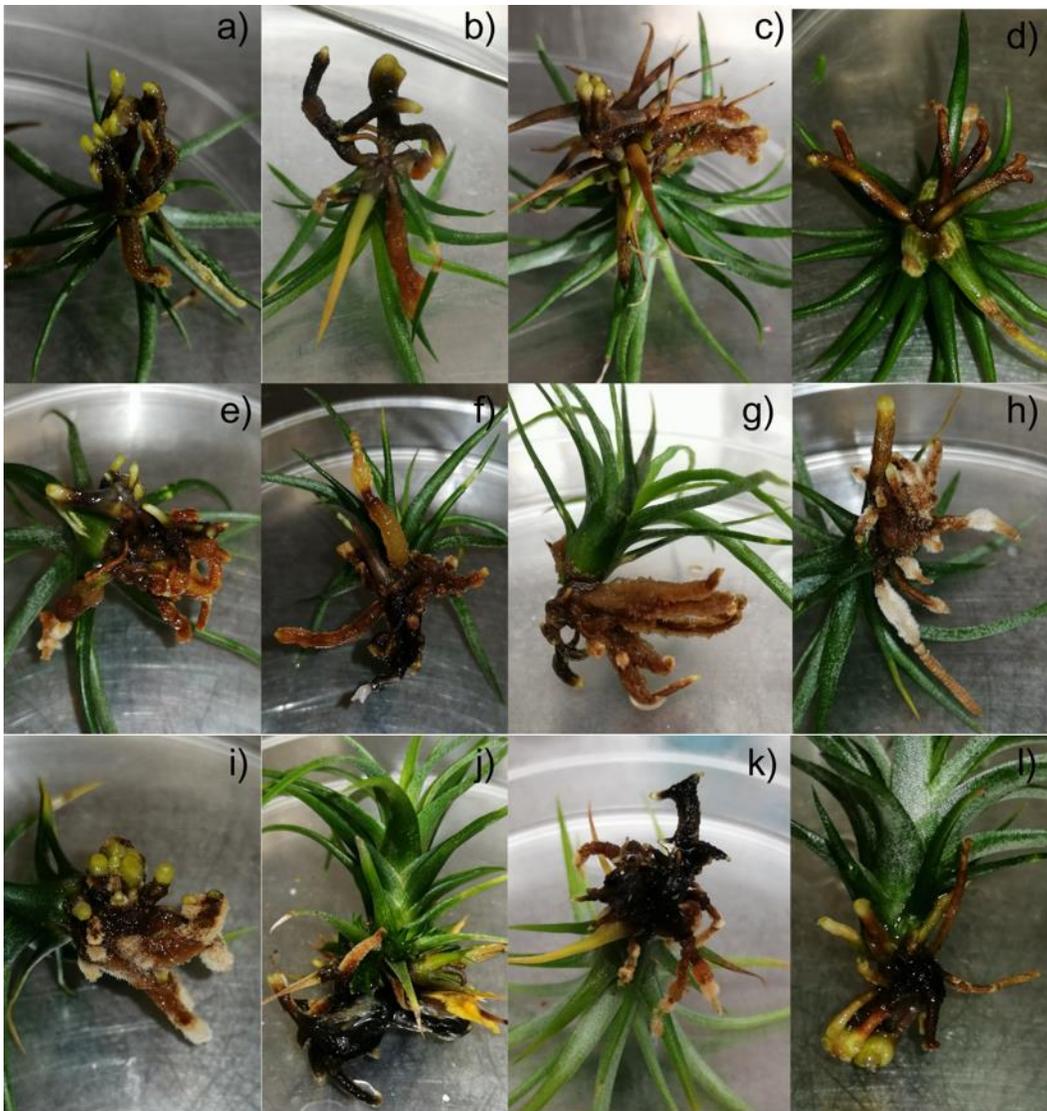


Figura 10. Plántulas con raíces adventicias engrosadas y cubiertas de tricomas: a, b, c, d, e, f) T4, g) T5, h, i) T7 j, k) T8 l) T9

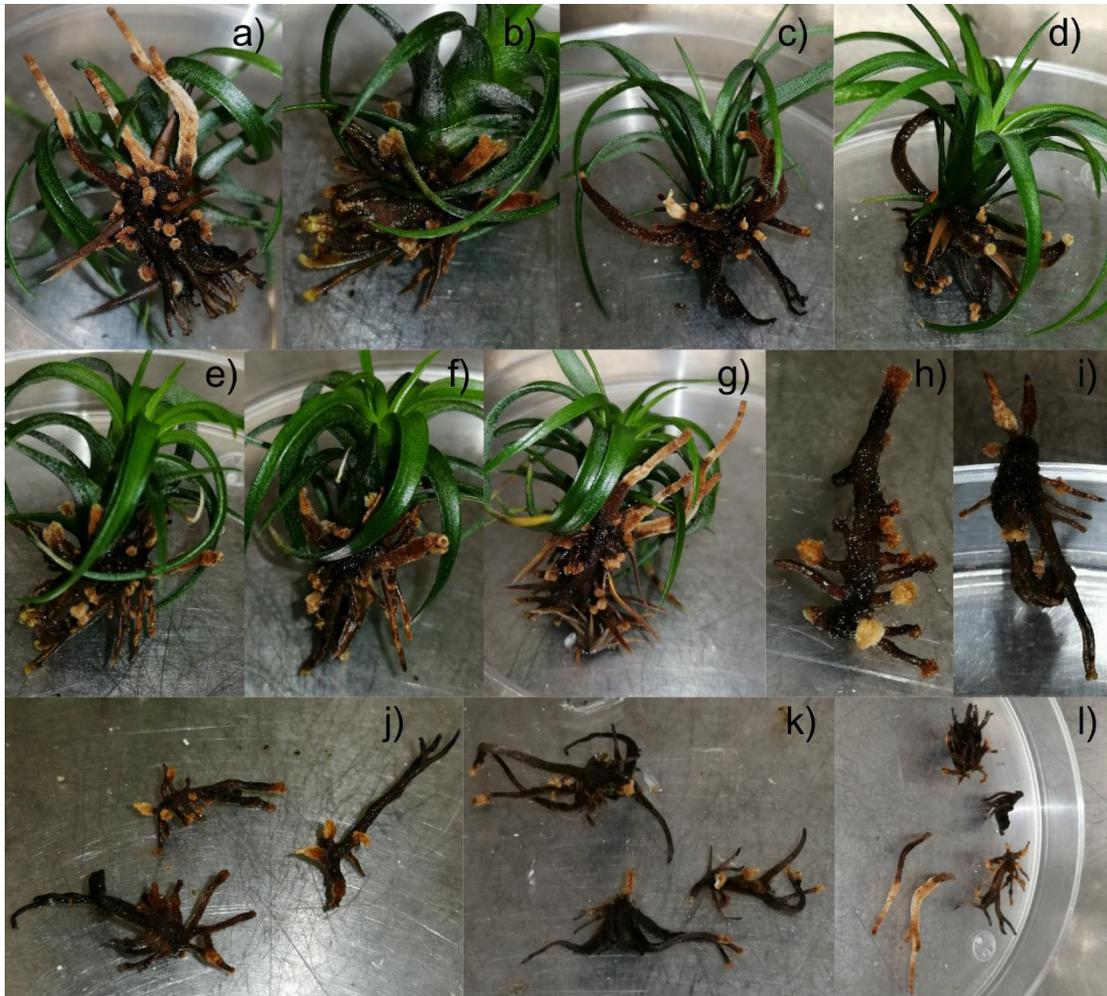


Figura 11. Ramificaciones del T9

Las raíces más gruesas tendieron a presentar mayor ramificación. Por otro lado, las de menor grosor tendieron a una menor ramificación y a un mayor número de raíces, en algunos casos formando cúmulos casi indistinguibles debido a que formaron un recubrimiento oscuro, y extremos de color verde (Figura 13).

Entre el T7 al T9 destacó la formación de estructuras nodulares y laminares de color verde entre las que también se podía notar un recubrimiento oscuro de tricomas (Figura 14), de modo que es posible que se hayan formado subsecuentemente al tipo de raíces anteriormente descrito y que se observa en la Figura 13.

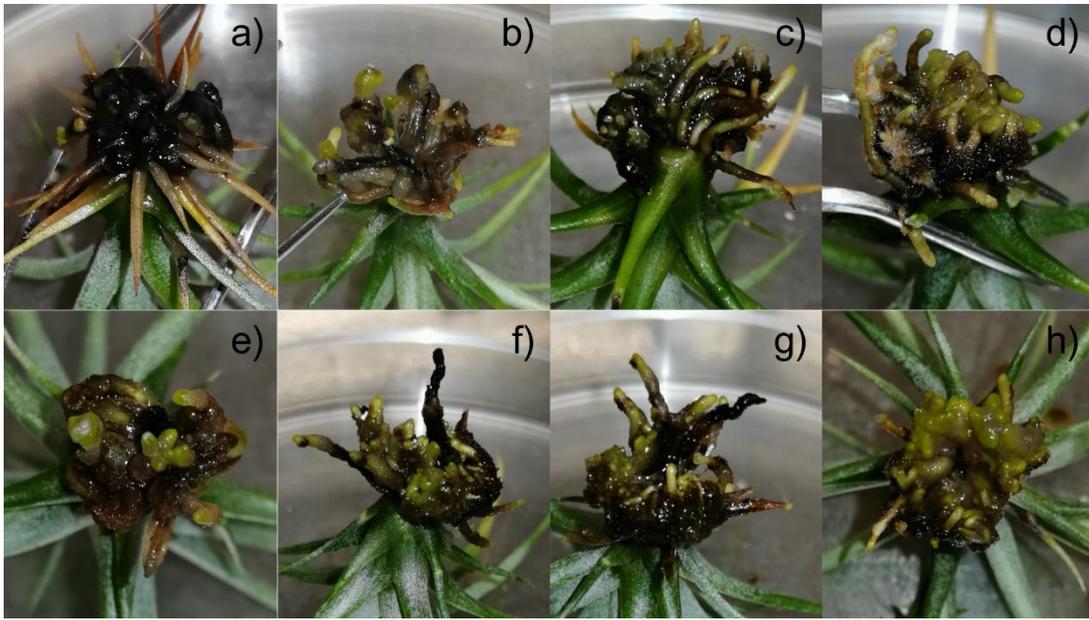


Figura 12. Cúmulos de raíces: a), b) T5, c), d) T8, e), f), g), h) T9

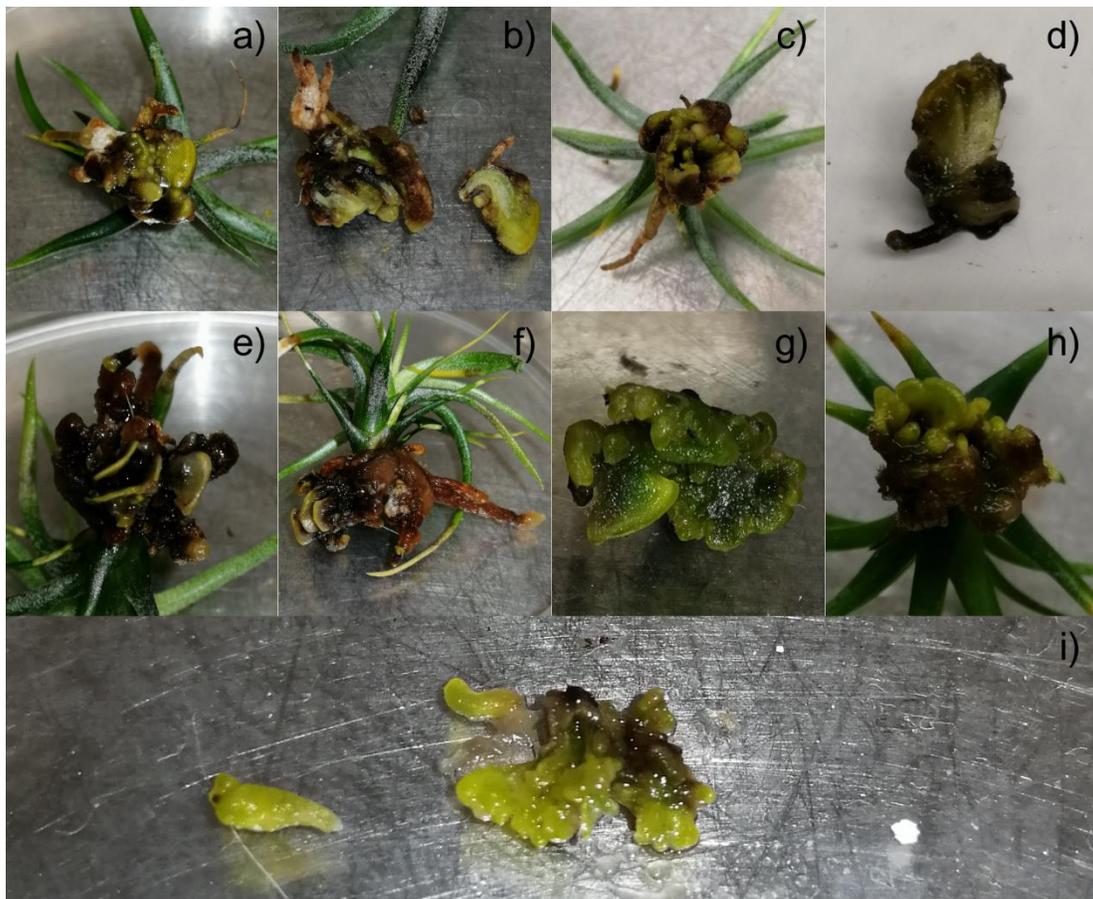


Figura 13. Estructuras nodulares y laminares: a), b), c), d), e), f) T7, g) T8, h), i) T9

## 8.4. LONGITUD TOTAL DE LA PLÁNTULA

El análisis de ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p=2.83E-12$ ) (Anexo 11), obteniéndose el promedio más alto en el T9 (34.03 mm), seguido del T5 (31.65 mm) y T4 (31.32 mm) (Cuadro 7, Figura 15). De acuerdo con la prueba de Tukey's pairwise, existen diferencias significativas del T4 hasta el T9 respecto al T1 y T2; y el T9 además, presenta diferencias con el T3 (Anexo 12).

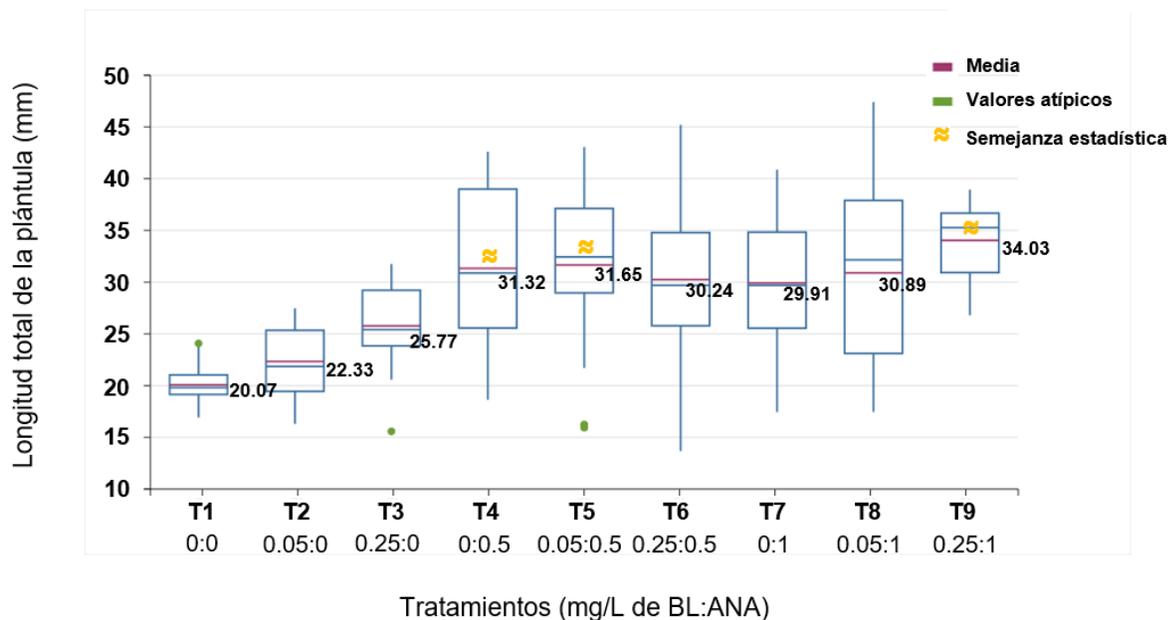


Figura 14. Longitud total de las plántulas de *Tillandsia imperialis* (mm) por tratamiento

## 8.5. BIOMASA

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de acuerdo con el análisis de ANOVA ( $p=8.984E-12$ ) (Anexo 14), siendo el mayor promedio para el T9 (1.25 g), seguido del T8 (0.95 g) y T4 (0.83 g) (Cuadro 7, Figura 16). En correspondencia a la prueba de Tukey's pairwise, se hallaron diferencias significativas en el T9 respecto a todos los tratamientos, mientras que en el T8 las diferencias estadísticas se encontraron para el T1 y el T5, y el T4 sólo se diferenció significativamente del T1 (Anexo 15).

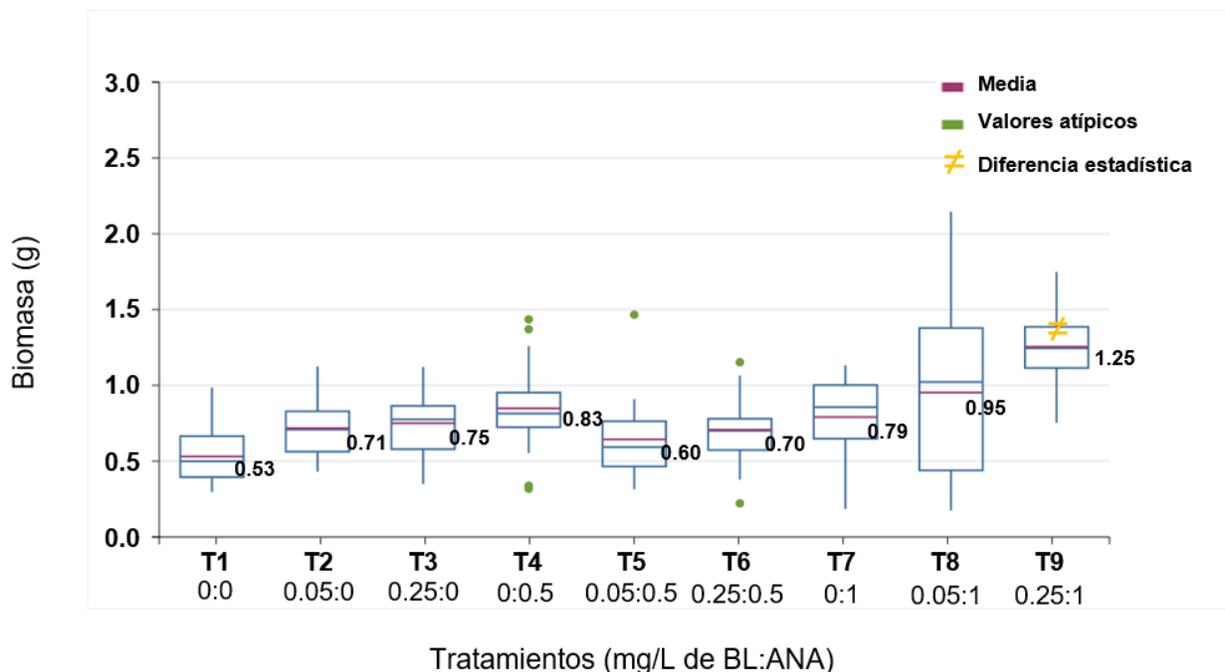


Figura 15. Biomasa (g) generada en las plántulas de *Tillandsia imperialis* por tratamiento

## 8.6. MORTALIDAD Y NECROSIS

Algunas plántulas del T2 (0.05 mg/L de BL) y del T3 (0.25 mg/L de BL) presentaron necrosis en una parte de sus hojas basales o apicales principalmente (Anexo 18), y tuvieron mayor crecimiento en brotes.

En las plántulas adicionadas con ANA (del T4 al T9) fue frecuente la necrosis de las hojas basales y raíces, pero sobre estas partes se formaron nuevas raíces adventicias distintas de las que se generaron inicialmente en las bases muertas (Anexo 19).

Se presentó mortalidad en tres individuos del T5, T6 y T7; y la mayor mortalidad fue para el T8, de 7 individuos. Generalmente los individuos que presentaron mortalidad no mostraron cambios.

Los individuos del T5 y T9 presentaron mortalidad de brotes en varios casos.

## VIII. DISCUSIÓN

### 9.1. NÚMERO DE BROTES

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis ( $p=2.681E-05$ ) (Anexo 2) aplicada al número de brotes de *Tillandsia imperialis*, las diferencias observadas entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas, destacando el T2 (0.05 mg/L de BL) con 13.61 brotes, seguido del T1 (control) con 9.14 brotes y del T3 (0.25 mg/L de BL) con 9.05 brotes (Cuadro 7, Figura 4), los cuales, de acuerdo con la prueba de Dunn's post hoc mostraron una semejanza estadística (Anexo 3).

Debido a la importancia de las citocininas y las auxinas para inducir la formación de órganos durante el cultivo *in vitro*, se ha probado frecuentemente la combinación de ambos reguladores de crecimiento. Márquez-Martínez (2019) obtuvo la mayor cantidad de brotes por explante de *T. viridiflora* (10.4) a las 12 semanas de inducción en medio MS (Murashige y Skoog) adicionado con 1.5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP) + 0.1 mg/L de ANA; por su parte, Hernández-Meneses *et al.* (2018) reportaron una mayor cantidad de brotes (6.8) en *Vriesea heliconioides* por medio de la combinación de 2.2 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de ANA a las 12 semanas de cultivo; de manera similar, Ferrara-de-Resende *et al.* (2016), reportaron que la alta concentración de BAP promovió una alta tasa de multiplicación en el cultivo *in vitro* de *V. cacuminis*, resultando un promedio de 9.3 brotes por explante en medio MS adicionado con 3.37 mg/L de BAP + 0.8 mg/L de ANA a los 90 días de cultivo.

En los anteriores reportes se pueden observar cantidades más elevadas de citocinina, y en menor proporción de auxina para la generación de brotes. Similarmente, Pickens *et al.* (2006) notaron que la suplementación de 2.0 mg/L de BAP + 0.1 mg/L de ANA en el cultivo de plántulas de *T. eizii* en medio KND modificado durante cuatro semanas generó un mayor número de yemas adventicias, obteniendo un porcentaje significativamente mayor de cultivos con yemas (40%). Tal observación apunta a que la citocinina es la encargada de favorecer la producción de brotes.

Trabajos que han evaluado únicamente la adición de la citocinina BAP reafirman lo dicho. Jiménez-Romero (2016) obtuvo un mayor número de brotes por explante de *T.*

*imperialis* en medios MS adicionados con 0.5 mg/L de BAP, siendo en promedio de cinco a los 60 días; mientras que los medios MS adicionados con BAP utilizados por Lopes-da-Silva *et al.* (2009) (0.0, 0.1, 0.2, 0.4 y 1.0 mg/L) en *V. scalaris*, mostraron una regresión lineal positiva, llegando a producir cerca de ocho brotes por explante en promedio mediante la concentración de 1.0 mg/L a los 120 días de cultivo; y Ördögh (2022) alcanzó el mayor número de brotes de *V. splendens* después de tres meses en cultivos de medio MS adicionados con 0.8 mg/L de BAP, con un promedio de 25.75 brotes por planta; seguido en eficiencia por la concentración de 0.4 mg/L de BAP con 21.78 de brotes en promedio; además, las citocininas ribósido de 6-benciladenina (RBAP) y meta-topolina (MT), también mostraron un aumento en la producción de brotes.

Por su parte, Pinto *et al.* (2013) evaluaron el efecto de BAP solo o en combinación con ANA en medios MS durante 24 semanas de cultivo en *T. gardneri*, alcanzando el promedio más alto de 1.92 brotes por explante con 2.0 mg/L de BAP; mientras que los tratamientos de 2.0 mg/L de BAP en combinación con 0.5 y 1.0 mg/L de ANA produjeron oscurecimiento en todas las plántulas, y este último produjo callos y mortalidad en el 50% de las plántulas. Como se demuestra, la adición de ANA no actuó de manera sinérgica en la producción de brotes. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en los tratamientos de *T. imperialis*, en los que se manifiesta la mayor producción de brotes en ausencia de ANA.

También cabe mencionar que las respuestas dependen de la capacidad morfogenética de cada especie, tal como lo reportan Droste *et al.* (2005), quienes indujeron un promedio de 0.72 brotes por explante de *V. gigantea* y 4.3 brotes por explante de *V. philippocoburgii* en medios Knudson (KND) adicionados con 2.0 mg/L de BAP + 0.5 mg/L de ANA a los cuatro meses, sugiriendo que tales variaciones están asociadas al genotipo de cada especie, aún dentro de un mismo género.

En lo referente a los efectos de los brasinoesteroides sobre especies de bromelias, el único trabajo encontrado fue el de Freitas *et al.* (2014), quienes obtuvieron el mayor promedio de yemas brotadas por sección de tallo de *Ananas comosus* (1.93) mediante la dosis de 1.0 mg/L de BIOBRAS-16 a los 120 días de siembra en maceteros con arena esterilizada (aplicada previamente a la siembra por inmersión durante cinco minutos y

después a los 30 y 60 días mediante aspersores manuales), demostrando también una correlación positiva entre la dosis de brasinoesteroide y el número de brotes.

Por otro lado, no se han encontrado reportes del efecto de brasinoesteroides en bromelias cultivadas *in vitro*; pero sí en especies de otras familias de angiospermas. Por ejemplo, Verma *et al.* (2012) emplearon explantes de nudo cotiledonar de plántulas de 10 a 12 días de edad de dos genotipos de cacahuete o maní (*Arachis hypogaea*) (M-13 y PBS24030), cultivados en medio MS suplementados con 0.5, 1.0 y 2.0 ml/L de Double (una formulación comercial de brasinoesteroide) solo y en combinación con 3.0 mg/L de BAP. El efecto del brasinoesteroide en la inducción de brotes para ambos genotipos reveló una mejora con las concentraciones crecientes del brasinoesteroide solo, mientras que la respuesta más efectiva de acuerdo al potencial de multiplicación se observó en el medio con 1.0 ml/L de Double + BAP, que fue aproximadamente 11 veces mayor que el control para el genotipo M-13 y 24 veces mayor del control para el genotipo PBS24030.

Mediante los resultados obtenidos y la información antes referida podemos señalar que los brasinoesteroides inducen la formación de brotes similar a como lo haría una citocinina, funcionando de manera más efectiva en ausencia de auxina, por lo tanto, no parece existir una sinergia entre ambas fitohormonas en este proceso. También cabe destacar que *T. imperialis* posee una alta producción de brotes, y aunque se presenta un aumento inducido por la adición de BL, no muestra diferencias significativas en ausencia de reguladores de crecimiento, por lo que puede descartarse el empleo de los mismos para reducción de costos si solamente se requiere generar brotes para el almacenamiento *in vitro* de germoplasma vegetal. Por otra parte, debido a que la alta producción de brotes mostró estar ligada a un crecimiento nulo o escaso aunado con necrosis de la plántula original, el subcultivo de brotes a medios que induzcan su crecimiento es ideal para formar plantas de talla óptima para la aclimatación *ex vitro*.

## 9.2. NÚMERO DE RAÍCES

De acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis ( $p=2.306E-12$ ) aplicada al número de raíces por plántula de *T. imperialis* (Anexo 5), las diferencias observadas entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas, destacando el T9 que contuvo la mayor concentración de reguladores de crecimiento (0.25 de BL + 1.0 mg/L de ANA) al

presentar el promedio más sobresaliente en esta variable de 13.2 raíces; le siguieron en rendimiento el T8 (0.05 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA) con un promedio de 12.62 raíces y el T7 (1.0 mg/L de ANA) con promedio de 11 raíces por plántula (Cuadro 7, Figura 8), los tres exhibiendo similitud estadística en base a la prueba de Dunn's post hoc (Anexo 6).

En lo referente a la formación de raíces, Márquez-Martínez (2019) refiere la obtención de un mayor número de raíces por plántula en promedio (2.4) mediante el empleo de 0.2 mg/L de ANA en *T. viridiflora* en medio MS tras seis semanas de cultivo. Por su parte, Ferrara-de-Resende *et al.* (2016) reportaron un efecto positivo sobre el enraizamiento de *V. caccuminis* en medios MS en combinación de 5.2 mg/L de AG3 + 2.0 mg/L de ANA, induciendo la formación de 2.3 raíces por planta a los 90 días de cultivo. Ördögh (2022) por su parte, reportó una producción máxima de 7.58 raíces en promedio de *V. splendens* después de tres meses en cultivos de medio MS adicionados con 0.2 mg/L de ANA.

Respecto al empleo de brasinoesteroides en bromelias, Capote *et al.* (2009), tras probar el efecto del análogo MH5 en sustratos con mezcla de zeolita más fibra de coco (1:1, v:v) + polvo enraizador con ácido indol-3-butírico (AIB) (492.12  $\mu\text{mol/mol}$ ), observaron un aumento estadísticamente significativo respecto al control en el número de raíces emitidas en brotes de un híbrido de *Vriesea* en todas las concentraciones empleadas del brasinoesteroide MH5 (0.01, 0.05 y 0.1 mg/L), que sin mostrar diferencias significativas entre sí, generaron un promedio de 2.06 a 2.62 raíces por brote a los 49 días en una cámara de crecimiento.

Aún faltan estudios en bromeliáceas que reporten la combinación de auxinas y brasinoesteroides para inducir la formación de raíces; sin embargo, cabe destacar estudios como el de Pacholczak *et al.* (2021) en el que se evaluó el enraizamiento de dos cultivares de esquejes de tallo de agracejo (*Berberis thunbergii*) en una mezcla de turba y perlita (2:1 v/v) rociados con soluciones acuosas de 1.0 mL de alcohol etílico y reguladores de crecimiento, empleando tratamientos con 200 mg/L de AIB, 0.05% de BL y 0.05% de 24-epibrassinolide (24-EBL), por separado y en combinación de la auxina con cada brasinoesteroide. Las aplicaciones conjuntas de auxina y ambos

brasinoesteroides alcanzaron un porcentaje de esquejes enraizados de 98.3% para el cultivar 'Maria' y de 100% para 'Red Rocket'; y el grado de enraizamiento fue mayor en combinación de BL + AIB para 'Maria' (4.6), mientras que para 'Red Rocket' fue mayor con la combinación de 24-EBL + AIB (4.6), demostrando una sinergia entre brasinoesteroides y auxinas en su capacidad de enraizamiento.

Los resultados obtenidos en *T. imperialis* prueban que las auxinas por sí solas son fundamentales en la estimulación de la rizogénesis, puesto que los niveles de BL por sí solo presentaron una formación de raíces casi nula. Sin embargo, de manera similar a lo observado por Pacholczak *et al.* (2021), se demuestra que los brasinoesteroides proporcionan un efecto sinérgico a las auxinas sobre la rizogénesis, ya que la presencia de BL aumentó los efectos de ANA; sólo que en este caso, la adición de 1.0 mg/L de ANA no muestra diferencias significativas en ausencia de BL, por lo tanto, si únicamente se tiene como objetivo la producción de brotes *in vitro* en *T. imperialis*, puede realizarse de manera efectiva con 1.0 mg/L de ANA.

### **9.3. LONGITUD DE LA RAÍZ MÁS LARGA**

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) ( $p=3.591E-06$ ) (Anexo 8), se constata que las diferencias observadas entre los distintos tratamientos tienen diferencias estadísticas significativas en lo que respecta a la longitud de la raíz más larga de *T. imperialis*; específicamente, el T9 (0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA) con el promedio más alto de 14.85 mm, seguido del T7 (1.0 mg/L de ANA) con un promedio de 13.05 mm y del T5 (0.05 mg/L de BL + 0.5 mg/L de ANA) con 11.58 mm de promedio (Cuadro 7, Figura 9), los cuales comparten semejanza estadística mostrada por la prueba de Tukey's pairwise (Anexo 9).

En referencia al alargamiento de raíces en bromelias inducido por auxinas, se encuentran estudios con *V. caccuminis* como el de Ferrara-de-Resende *et al.* (2016), quienes reportan la obtención de raíces adventicias estadísticamente más largas (de 0.14 a 0.15 mm) en medios MS suplementados con  $AG_3 + 0.2, 0.4, 0.6$  y  $0.8$  mg/L de ANA,  $0.02$  mg/L de AIA y  $0.08$  mg/L de AIB a los 90 días de cultivo. Otros estudios como el de Márquez-Martínez (2019), sobre *T. viridiflora*, evidencian la mayor longitud de raíces de 15 mm en promedio bajo la inducción con AIB en dos concentraciones por

separado de 0.2 mg/L y 0.4 mg/L en la etapa de enraizamiento en medio MS tras seis semanas de cultivo. Ördögh (2022) por su parte, obtuvo un alargamiento máximo de 26.88 mm en promedio sobre las raíces de *V. splendens* después de 3 meses en cultivos de medio MS adicionados con de 0.8 mg/L de ANA.

En cuanto al uso de brasinoesteroides sobre el crecimiento de raíces de bromeliáceas no se encuentran reportes. Sin embargo, estudios en otras familias de angiospermas confirman un efecto sinérgico de estos con las auxinas en el alargamiento de raíces, como el de Pacholczak *et al.* (2021) en dos cultivares de esquejes de *B. thunbergii*, en el que las raíces más largas del cultivar 'Maria' resultaron de los esquejes tratados con las combinaciones de BL + AIB y 24-EBL + AIB, alcanzando 48 mm en promedio; mientras que para 'Red Rocket' las raíces más largas se lograron con 24-EBL + AIB, con un promedio de 49 mm, seguidas del tratamiento con 24-EBL sólo con 48 mm dentro del mismo grupo estadístico. De este modo se observa que si bien la aplicación de AIB y los brasinoesteroides por separado generaron un aumento significativo en la longitud de las raíces, la aplicación conjunta de ambos grupos de reguladores produjo la mayor elongación de las mismas.

Los resultados obtenidos con *T. imperialis* también muestran que existe sinergia entre ambos grupos de hormonas, donde ANA promovió el alargamiento de las raíces por sí solo y lo demostró de manera óptima mediante la adición de BL en el T9 (0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA); sin embargo, la adición de 1.0 mg/L de ANA por sí sólo no muestra diferencias significativas respecto a la adición de BL, por lo tanto, es posible emplear únicamente esta concentración de ANA en el cultivo *in vitro* de esta especie para reducir costos si solamente se pretende estimular el alargamiento de las raíces.

#### **9.4. LONGITUD TOTAL DE LA PLÁNTULA**

De acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) ( $p=2.83E-12$ ) (Anexo 11), se evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en relación con la longitud total de plántulas de *T. imperialis*. Es importante resaltar que el T9 (0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA) exhibe el mejor promedio de 34.03 mm, seguido por el T5 (0.05 mg/L de BL + 0.5 mg/L de ANA) con un promedio de 31.65 mm y del T4 (0.5 mg/L de ANA) con 31.32 mm de promedio (Cuadro 7, Figura 15), los cuales muestran

homogeneidad estadística entre sí en correspondencia con la prueba de Tukey's pairwise (Anexo 12).

Hernández-Meneses *et al.* (2018) obtuvieron el promedio más alto de 8.3 mm en longitud de brotes de *V. heliconioides* en medios MS combinados con 1.1 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de ANA a las 12 semanas con diferencias significativas al resto de concentraciones, y los tratamientos con 0.3 mg/L de AG<sub>3</sub> promovieron un mayor alargamiento de los brotes de 76 mm a las 12 semanas de cultivo en contraste con los medios MS sin AG<sub>3</sub>; mientras que Castañeda-Ramírez (2017) obtuvo un promedio de 9.5 mm de altura en el establecimiento *in vitro* de meristemos apicales de *Neoregelia carolinae* en medios MS suplementados con 1.8 mg/L de ANA a los 35 días, y de 8.1 mm adicionados con 1.0 mg/L de BAP sin diferencias significativas; por su parte, Ördögh (2022) alcanzó un máximo de 35.56 mm de altura en promedio en plantas de *V. splendens* adicionadas con ANA a la concentración de 0.2 mg/L después de tres meses en cultivos de medio MS.

En cuanto al efecto inducido por brasinoesteroides, Capote *et al.* (2009) no encontraron diferencias significativas de alargamiento de brotes a los 49 días de aclimatación de un híbrido de *Vriesea*, mediante la adición o no adición del brasinoesteroide MH5 utilizando tratamientos de 0.0, 0.01, 0.05 y 0.1 mg/L; por el contrario, Freitas *et al.* (2014) obtuvieron el mayor promedio de longitud de brotes de 169 mm inducidos en secciones de tallo de *A. comosus* mediante la dosis de 1.0 mg/L de BIOBRAS16 a los 120 días después de la siembra en sustrato de arena esterilizado.

A falta de evidencia, es necesario que se realicen pruebas sobre la interacción sinérgica entre brasinoesteroides y auxinas en el alargamiento de plántulas de bromelias. Por su parte, este efecto ya se ha comprobado en otras familias, como lo demostró Tanaka *et al.* (2003) sobre el alargamiento del hipocótilo en *Arabidopsis thaliana*, tras la incubación de semillas en placas de Petri, donde el efecto de AIA en combinación de BL produjo un mayor alargamiento que al utilizar concentraciones de cada regulador por separado, siendo el mejor resultado de 0.048 mg/L de BL + 0.0175 mg/L de AIA (7 mm).

Los resultados obtenidos de *T. imperialis* coinciden en demostrar el papel principal de ANA en el crecimiento de las plántulas con un aumento adicionado por BL, obteniendo

el resultado más óptimo mediante la suplementación con 0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA (T9); sin embargo, la adición de 0.5 mg/L de ANA por sí solo no presenta diferencias significativas con respecto a la adición de las concentraciones de BL, de manera que la suplementación con ANA es suficiente para inducir el crecimiento en longitud de las plántulas.

## 9.5. BIOMASA

Basándonos en los resultados derivados del análisis de varianza (ANOVA) ( $p=8.984E-12$ ) (Anexo 14), se confirma que las diferencias entre los distintos tratamientos poseen una significancia estadística en términos de biomasa. De manera específica el T9 (0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA) destaca al exhibir el promedio más alto en este parámetro con 1.25 g. Le siguen en rendimiento el T8 con 0.95 g y el T4 con 0.83 g de promedio (Cuadro 7, Figura 16); sin embargo, el T9 se encuentra separado estadísticamente del resto de tratamientos debido a las diferencias significativas que muestra la prueba de Tukey's pairwise (anexo 15).

Ördögh (2022), obtuvo la mayor eficiencia en el aumento del peso fresco de *V. splendens* después de tres meses en cultivos de medio MS adicionados con 0.8 mg/L de ANA, alcanzando un promedio de 1.13 g. Una concentración similar a los niveles de ANA probados en *T. imperialis* con un efecto similar en el aumento de la biomasa.

En cuanto a brasinoesteroides se refiere, sólo existen reportes bajo condiciones de invernadero. Freitas *et al.* (2014) obtuvieron el mayor promedio de peso fresco de 32-34 g en *A. comosus* mediante la dosis de 1.0 mg/L de BIOBRAS-16 a los 120 días de siembra en sustrato de arena esterilizado; mientras que Aragão-Catunda *et al.* (2008) registraron la mayor producción de materia fresca para *A. comosus* mediante 0.1 mg/L de BIOBRAS-16 en sustrato de bagazo de caña de azúcar + sustrato de torta de filtración a los 150 días de la siembra, sobrepasando los 17 g.; y en la aclimatación de brotes de un híbrido de *Vriesea*, la concentración más alta del brasinoesteoide MH5 evaluado por Capote *et al.* (2009) (0.1068 mg/L) indujo un aumento significativo en la masa fresca de los brotes, obteniendo 0.50 g en promedio, comparada al resto de los tratamientos a los 49 días, mientras que la menor masa fresca estadísticamente significativa se obtuvo

tanto en la concentración más baja evaluada (0.0103 mg/L) (0.34 g) como en el control sin MH5 (0.39 g).

Los resultados obtenidos en *T. imperialis* aunados con los reportes anteriores, reafirman que existe un efecto sinérgico entre las auxinas y los brasinoesteroides, así como entre ANA y BL para el crecimiento de las plantas, reflejándose de manera significativa en el aumento de la biomasa, siendo esta la suma de la masa generada a consecuencia del crecimiento del resto de tejidos de la planta. De esta manera, la suplementación con ANA y BL muestra un efecto óptimo en el crecimiento general de plántulas de *T. imperialis* cultivadas *in vitro*.

## 9.6. MORTALIDAD Y NECROSIS

Generalmente los individuos con mortalidad en los tratamientos de *T. imperialis*, a la vez inhibieron su crecimiento y presentaron algún tipo de contaminación. El T9 (0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA), que corresponde a las concentraciones más altas de la interacción de brasinoesteroide y auxina, presentó menor necrosis en las hojas a la par de un notable crecimiento en la totalidad de individuos aún en medios contaminados por hongos y bacterias; mientras que la mayor mortalidad, que fue de siete individuos fue para el T8 (0.05 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA), siendo la concentración más baja de BL y la más alta de ANA.

Esto podría deberse a las propiedades de resistencia al estrés reportadas por los brasinoesteroides tanto a factores abióticos como la alta salinidad, la sequía, cambios bruscos de temperatura y agentes químicos como plaguicidas y herbicidas; así como a factores bióticos como plagas (Salgado-Garciglia *et al.*, 2008).

La resistencia proporcionada por brasinoesteroides en bromelias fue observada por Capote *et al.* (2009), quienes obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia de brotes de un híbrido de *Vriesea* adicionados con tratamientos del brasinoesteroide MH5 con respecto al control sin MH5 en la fase de aclimatación, donde el porcentaje significativamente más bajo de supervivencia en el día 49, de 66%, se presentó en las plantas sin aplicación de MH5, mientras que los tratamientos de MH5 (0.01, 0.05 y 0.1 mg/L) no presentaron diferencias significativas entre sí. Similarmente se ha visto en otras

familias, por ejemplo, en plántulas de banano FHIA-18 aclimatadas por González-Olmedo *et al.* (2005), la aspersion de 0.1 mg/L del brasinoesteroide MH5 produjo una supervivencia del 100% bajo condiciones de estrés térmico, además de reducir el porcentaje de plantas con manchas en las hojas y los contenidos de prolina libre (cuya acumulación representa un mecanismo de resistencia frente al estrés).

Un análisis estadístico evaluando factores bióticos y abióticos de estrés en las plantas podría aplicarse a variables de necrosis y mortalidad en futuras investigaciones para afirmar el efecto de los brasinoesteroides en *T. imperialis*.

## **9.7. RAÍCES ADVENTICIAS CON TRICOMAS Y GRAVITROPISMO NEGATIVO**

Se ha reportado que las auxinas pueden inducir la producción de raíces adventicias (Suárez-Padrón, 2020). Adicionalmente, Altamura *et al.* (2023) recopilaron evidencia de que los brasinoesteroides, además de las auxinas, controlan la formación y alargamiento tanto de raíces laterales como adventicias. Constatando lo anteriormente reportado, la formación de raíces adventicias de *T. imperialis* en el presente trabajo se produjo en todos los tratamientos adicionados con ANA sólo o en combinación con todas las concentraciones de BL (T4-T9) (Cuadro 7). La mayor parte de las raíces contabilizadas de hecho, fueron raíces adventicias, las cuales permitieron una separación de las partes necrosadas en la base de las plantas, a partir de las cuales crecieron estructuras en estado saludable.

Cabe destacar que las raíces adventicias generadas en *T. imperialis* presentaron un considerable engrosamiento y formación de tricomas, lo cual puede favorecer la captación de nutrientes, puesto que en diversas especies de bromeliáceas, el agua de la lluvia acumulada entre las vainas foliares en combinación de la materia orgánica, proveen nutrientes que son absorbidos a través de raíces adventicias nacidas de las bases foliares y de tricomas especializados, como se describe por Cabral *et al.* (2010).

El ácido giberélico (AG) es la fitohormona principalmente involucrada en el desarrollo de los tricomas, y a su vez se ha observado que la auxina AIA es capaz de interactuar con el AG regulando la iniciación de los tricomas y aumentando la densidad

de éstos; y de manera más reciente, se ha observado que los brasinoesteroides inducen la iniciación y el alargamiento de las fibras de algodón (tricomas unicelulares) (Li *et al.*, 2021). Lo anterior sugiere que las concentraciones de ANA y BL estuvieron involucrados en la formación de los tricomas.

Además, el gravitropismo negativo presentado frecuentemente entre estos tratamientos, también puede tener relación a la captación de nutrientes, o bien, como un modo de anclaje estratégico para la supervivencia de las plántulas. Se ha sugerido que *Tillandsia* puede producir raíces con crecimiento hacia arriba para sujetarse a la parte inferior de las ramas de los árboles, sitio en que la plántula obtiene refugio de la radiación solar hasta que crece y se vuelve lo suficientemente resistente para trepar a las partes superiores de las ramas (Godman, 2017).

Así mismo, el gravitropismo está regulado por AIA y los estatolitos, los cuales son organelos receptores de gravedad que se desplazan por el citoplasma en función del estímulo gravitatorio, que en el caso de las angiospermas corresponden a los amiloplastos, y las células que los contienen se denominan estatocitos, agrupados en el caso de la raíz en la columela de la caliptra radicular. La respuesta gravitrópica está asociada con la sedimentación de los amiloplastos causando presión sobre el retículo endoplásmico de los estatocitos, el cual libera  $Ca^{2+}$  que a su vez conduce el transporte de AIA desde las células de la columela hasta la zona de elongación de la raíz, provocando un gradiente de AIA que induce el curvamiento en dirección hacia la fuerza de gravedad en consecuencia del alargamiento celular (Moysset y Simón, 2013).

Kim *et al.* (2000) complementaron la ya descrita actividad gravitrópica del AIA en las raíces de las plantas demostrando la presencia y efecto sinérgico de los brasinoesteroides en este proceso. Tras la incubación durante dos horas de raíces de *Zea mays* en soluciones adicionadas con niveles de BL y AIA, se observó pasadas las cinco horas, que BL aumentó la curvatura gravitrópica de las raíces primarias de *Z. mays* en todas las concentraciones probadas (0.00048, 0.0048, 0.048, 0.48 y 4.8 mg/L), obteniendo el grado más alto con 0.048 mg/L; mientras que a partir de 0.48 mg/L se inhibió el alargamiento, indicando que BL puede afectar el alargamiento y la curvatura de la raíz por separado. Adicionalmente probaron el efecto o ausencia de BL mediante la

concentración óptima (0.048 mg/L) en combinación con AIA (0.00017, 0.0017, 0.017, 0.17 y 1.75 mg/L), resultando siempre un aumento en la curvatura de la raíz inducida por AIA en presencia de BL, y de manera óptima mediante 0.017 mg/L de AIA + 0.05 mg/L de BL.

De este modo, existe evidencia de que auxinas y brasinoesteroides realizan una función sinérgica en el gravitropismo de las raíces.

Por otro lado, la proteína de respuesta gravitrópica negativa de las raíces (NGR), expresada en la membrana plasmática de las células de la columela y de la cofia radicular lateral, descrita por Ge y Chen (2019), es esencial para la respuesta gravitrópica positiva de las raíces, puesto que regula la localización de las proteínas PIN (transportadoras de auxina a través de las membranas) preferentemente en la membrana plasmática de la parte inferior de las células de la columela y la dirección del flujo de auxinas hacia el flanco inferior de las raíces en respuesta a la gravedad. Lo anterior se ve invertido en ausencia de NGR, donde el flujo de auxina se acumula mayoritariamente en el flanco superior en la raíz, ocasionando un crecimiento gravitrópico negativo de las raíces. Este proceso fue observado tras el aislamiento de un mutante NGR de *Medicago truncatula* y la posterior generación del triple mutante atNGR1,2,3 de *A. thaliana*.

Puesto a que el fenómeno del gravitropismo negativo en raíces sólo se ha reportado anteriormente en mutaciones de genes, habría que definir mediante estudios adicionales si lo que se presentó en *T. imperialis* se deba también a una mutación inducida por los niveles de reguladores de crecimiento, o si es un fenómeno natural que favorece a la adaptación de la especie como se ha descrito con anterioridad para este género.

Por último, no se encontró información que coincidiera con las estructuras nodulares y laminares presentadas en algunas de las raíces de *T. imperialis* del T7 hasta el T9 (Figura 14), que contuvieron la concentración más alta de ANA (1.0 mg/L).

## IX. CONCLUSIONES

- Los brasinoesteroides inducen la formación de brotes en el cultivo *in vitro* de *T. imperialis* en ausencia de auxina, resultando una producción más efectiva mediante la adición de 0.05 mg/L de BL; sin embargo, *T. imperialis* tiene una alta producción de brotes sin mostrar diferencias significativas en ausencia de reguladores de crecimiento.
- La adición de un brasinoesteroide a las dosis de auxina proporciona un efecto sinérgico con respecto a la producción y alargamiento de raíces, altura total de la plántula y generación de biomasa.
- La interacción de 0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA promueve óptimamente la producción de raíces (principalmente adventicias) y el alargamiento de las mismas, así como el aumento de la longitud de las plántulas y en consecuencia, de la biomasa. Sin embargo, la ausencia de BL en el tratamiento con la dosis óptima de ANA no muestra diferencias significativas para las variables anteriores con excepción de la biomasa generada, siendo esta la suma acumulada de todas las variables medidas.
- La suplementación con 0.5 y 1.0 mg/L de ANA y con 0.05 y 0.25 mg/L de BL solos o en combinación, no indujeron la formación de callos, por lo tanto, la morfogénesis fue directa para todos los tratamientos.
- Los niveles más altos de la interacción de ANA y BL correspondientes a 0.25 mg/L de BL + 1.0 mg/L de ANA mantuvieron plántulas sin necrosis ni mortalidad aún en medios contaminados.
- Se observó la presencia de raíces adventicias con gravitropismo negativo cubiertas de tricomas en los tratamientos que contenían todos los niveles de ANA (T4-T9; 0.5 y 1.0 mg/L) independientemente de su interacción con BL. A su vez, estructuras nodulares y laminares aparecieron en las raíces adventicias de los tratamientos que contuvieron dosis de 1.0 mg/L de ANA, independientemente de la presencia de BL (T7-T9).

## **X. RECOMENDACIONES**

- Se propone contar con los brotes enraizados como nueva variable si llegara a presentarse una cantidad considerable.
- Se sugiere que en futuras investigaciones se tomen en cuenta las variables de raíces adventicias, formación de tricomas y gravitropismo negativo; así como analizar los tricomas por medio de microscopía y analizar la formación y causas de las estructuras nodulares y laminares en los tratamientos donde se presentan.
- Se recomienda evaluar factores de estrés a variables de necrosis y mortalidad para conocer el efecto de los brasinoesteroides.

## XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Altamura, M. M., Piacentini, D., Della Rovere, F., Fattorini, L., Falasca, G. y Betti, C. 2023. New Paradigms in Brassinosteroids, Strigolactones, Spingolipids, and Nitric Oxide Interaction in the Control of Lateral and Adventitious Root Formation. *Plants*. 12(2): 413.
- Aragão-Catunda, P. H., Sales-Marinho, C., Menezes-de-Assis Gomes, M. y Cordeiro-de-Carvalho, A. J. 2008. Brassinosteroides e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 30(3): 345-352.
- Aranda-Coello, J. M., Naranjo, E. J. y Ochoa-Ochoa, L. 2012. Evaluation of some effects of traditional harvesting of bromeliads on the forest herpetofauna in Chanal, Chiapas. *Acta Zoológica Mexicana*. 28(3): 621-624.
- Arredondo-Gómez, A., Ávila-Ayala, R y Muñoz-Gutiérrez, L. 2012. Fichas descriptivas de 52 plantas ornamentales que se comercializan en la Huasteca Potosina. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México.
- Aryal, S. (2022) Micropropagation: Stages, Types, Applications, Advantages, Limitations. Microbe notes. <https://microbenotes.com/micropropagation-stages-types-applications-advantages-limitations/>. Consultado el 4 de julio de 2024.
- Ballinas-Aquino, M. L. 2022. La fiesta del Niño Florero: una mirada socioambiental entre fronteras. *Revista pueblos y fronteras digital*. 17: 1-27.
- Beutelspacher-Baigts, C. R. y Farrera-Sarmiento, O. 2007. Tradición vs conservación: La "topada de la Flor". *Lacandonia*. 1(1): 109-113.
- Cabral, E. L., López, E. S. y Sobrado, S. V. 2010. Monocotiledóneas. Diversidad vegetal. Biotaxonomía de spermatofitas. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, Argentina.
- Capote, I., Escalona, M., Daquinta, M., Pina, D., González, J. y Aragón, C. 2009. Efecto del análogo de brasinoesteroide (MH5) en la aclimatización de los brotes de

- Vriesea* propagados en sistemas de inmersión temporal. *Ciencia y Tecnología*. 2(1): 29-33.
- Castañeda-Ramírez, D. F. 2017. Establecimiento *in vitro* de la bromelia *Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Sm. Tesis de Licenciatura. Carrera de Ingeniería Agronómica. Universidad Zamorano. Francisco Morazán, Honduras.
- Castillo-Salle, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA Las Brujas. Canelones, Uruguay.
- Cruz-García, S., Garrido-Jiménez, I. e Hornung-Leoni, C.T. 2010. Las bromelias como importantes fito-telmata. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 7(1): 8-10.
- Dal-Vesco, L.L. y Guerra, M. P. 2010. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Horticulturae*. 125 (4): 748-755.
- Droste, A., Machado-da-Silva, A., Vieira-Matos, A. y Winck-de-Almeida, J. 2005. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48(5): 717-722.
- Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018. La familia Bromeliaceae en México. *Botanical Sciences*. 96(3): 533-554.
- Farrera-Sarmiento, O. 2013. Plantas de Chiapas en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial. *Lacandonia*. 7(1): 19-29.
- Ferrara-de-Resende, C., Ribeiro, C., Camargo-Mendes, G., Quinhones-Godoy-Soares, C., Fernandes-Braga, V., da-Cruz, B. P., Campostrini-Forzza, R. y Pereira-Peixoto, P. E. 2016. *In vitro* culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia, Série Botânica*. 71(1): 55-61.
- Freitas, S. de J., Santos, P. C., Berilli, S. da S., Lopes, L. C. y Carvalho, A. J. C. 2014. Brotação, desenvolvimento e composição nutricional de mudas de abacaxizeiro

- provenientes de gemas axilares submetidas ao brassinosteroide. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 9(1): 19-24.
- García-Ruíz L.J. 2011. Inducción a la germinación y crecimiento *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) Orchidaceae. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Pp. 50-51.
- Ge, L., y Chen, R. 2019. Negative gravitropic response of roots directs auxin flow to control root gravitropism. *Plant, Cell and Environment*. 42: 2372–2383.
- Gisbert-Doménech, C. 2010. Morfogénesis: la ruta organogénica versus la ruta embriogénica. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11526/Microsoft%20Word%20-%20art%C3%ADculo%20docente%20cgisbert%20sept2010.pdf>. Consultado el 25 de agosto de 2024.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2021. *Tillandsia imperialis* É.Morren ex Roezl. Global Biodiversity Information Facility. <https://doi.org/10.15468/39omei>. <https://www.gbif.org/species/2695858>. Consultado el 17 de septiembre de 2022.
- Godman, L. 2017. Tillandisimania. Photo-syn-thesis.
- Gonzalez-Olmedo, J. L., Córdova, A., Aragón, C. E., Pina, D., Rivas, M. y Rodríguez, R. 2005. Efecto de un análogo de brasinoesteroides sobre plántulas de FHIA-18 expuestas a un estrés térmico. *InfoMusa*. 14(1): 18-20.
- Google Maps/Google Earth. 2022. Ubicación de Universidad de Ciencias y Artes de 51 Chiapas. <https://www.google.com/maps/@16.774957,-93.12281,1668m/data=!3m1!1e3?hl=es-ES>. Consultado el 24 de octubre de 2022.
- Gouda, E. J. y Butcher, D. (2020). A list of accepted Bromeliaceae names. <http://bromeliad.nl/bromNames>. Consultado el 23 de enero de 2024.
- Halliday, K. J. 2004. Plant Hormones: The Interplay of Brassinosteroids and Auxin. *Current Biology*. 14(23): 1008-1010.

- Hernández-Meneses, E., Rangel-Estrada, S. E., López-Peralta, M. C. G., Guerrero-Hilario, A., Ortiz-Gil, G. y Martínez-Bolaños, L. 2018. Germinación, viabilidad y regeneración *in vitro* de plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 41(2): 99-106.
- Hernández-Sánchez, S. 2022. Cultivo de tejidos vegetales para propagar y conservar especies mexicanas amenazadas. *Herreriana*. 3(2): 28-32.
- Jiménez-Romero, V. D. 2016. Inducción a brotes *in vitro* en *Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roezl. (Bromeliaceae). Tesis de Licenciatura. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Universidad Tecnológica de la Selva. Chiapas, México.
- Kim, S.-K., Chang, S.C, Lee, E.J., Chung, W.-S., Kim, Y.-S., Hwang, S. y Lee, J.S. 2000. Involvement of Brassinosteroids in the Gravitropic Response of Primary Root of Maize. *Plant Physiology*. 123(3): 997-1004.
- Lee-Whiting, T. A. 2001. El niño florero: una tradición chiapaneca. En: Anuario 2001 del Centro de Estudios Superiores de México y Centroamérica. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México. Pp. 161-179.
- Li, J., Wang, X., Jiang, R., Dong, B., Fang, S., Li, Q., Lv, Z. y Chen, W. 2021. Phytohormone-Based Regulation of Trichome Development. *Frontiers in Plant Science*. 12:734776.
- Lluna-Duval, R. 2006. Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. En: Artal, Francisco R. (Eds.). Productos ecológicos-orgánicos de "Artal". Abonos Artal Valencia. Valencia, España. Pp. 22-26.
- Lopes-da-Silva, A. L., Henz-Franco, E. T., Bortoluzzi-Dornelles, E., Reichert-Bortoli, C. L. y Quoirin, M. 2009. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). *Iheringia, Série Botânica*. 64(2): 151-156.
- Márquez-Martínez, J. 2019. Morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker. Tesis de Maestría. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Colegio de Postgraduados. Estado de México. México.
- Montaldi, E. R. 1992. Morfogénesis vegetal. Una mini revisión. *AgriScientia*. 9(1): 31-36.

- Morales-Rubio, M. E., Espinosa-Leal, C. y Garza-Padrón, R. A. 2016. Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En: Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., y Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScience. Barcelona, España. Pp. 351-410.
- Moysset, L. y Simón, E. 2013. Movimientos de las plantas: tropismos y nastias. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España. Pp. 483-498.
- Ördögh, M. (2022). Morphological, physiological features and differences of *Vriesea splendens* 'Fire'plants during *in vitro* multiplication and rooting. *International Journal of Horticultural Science*, 28: 78-85.
- Pacholczak, A., Zajączkowska, M. y Nowakowska, K. 2021. The Effect of Brassinosteroids on Rooting of Stem Cuttings in Two Barberry (*Berberis thunbergii* L.) Cultivars. *Agronomy*. 11(4): 699.
- Palacios-Gama, Y. 2015. *Niluyarilo*: Espíritu de Niño en la Flor. Paisaje y memoria ritual en el viaje de los Floreros en Chiapa de Corzo. Tesis de Doctorado. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México.
- Palacios-Gama, Y. 2017. En busca de la flor de *Niluyarilo*. Implicaciones antropológicas. *Cuadernos de Antropología*. 27(1): 1-27.
- Perea, M. 2009. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Pickens, K. A., Wolf, J., Affolter, J. M. y Wetzstein, H. Y. 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In vitro Cellular & Developmental Biology*. 42(4):348-353.
- Pinto, A. C. R., Demattê, M. E. S. P., Santos, D. M. M., Barbosa, J. C. y Creste, S. 2013. Growth Regulators for *In Vitro* Propagation of *Tillandsia gardneri* (Bromeliaceae). *Acta Horticulturae*. 1002(1002): 51-57.

- Ramírez-Morillo, I. 2010. Bromelias. En: Durán-García, R. y Méndez-González, M. E. (Eds.). Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. Yucatán, México. Pp. 183-184.
- Royal Botanic Gardens, Kew. 2023. *Tillandsia imperialis* É.Morren ex Roezl. Plants of the World Online. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:2928162-1>. Consultado el 24 de marzo de 2023.
- Salgado-Garciglia, R., Cortés-Rodríguez, M. A. y Del Río, R. E. 2008. Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Biológicas*. (10):18-27.
- Seeta, S., Vidya, B., Sujatha, E. y Anuradha, S. 2002. Brassinosteroids- A new class of phytohormones. *Current Science*. 82(10): 1239-1245.
- Segura, J. 2013. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En: Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds.). Fundamentos de fisiología vegetal. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid, España. Pp. 351-376.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010, Segunda Sección. México, D.F.
- Singh, J. y Kumar, A. 2020. Plant Tissue Culture and Its Application in Agriculture as Biotechnological Tool. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 11: 274-284.
- Suárez-Padrón, I. E. 2020. Cultivo de tejidos vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. Córdoba, Colombia.
- Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T. y Okamoto, S. 2003. Physiological Roles of Brassinosteroids in Early Growth of *Arabidopsis*: Brassinosteroids Have a Synergistic Relationship with Gibberellin as well as Auxin

- in Light-Grown Hypocotyl Elongation. *Journal of Plant Growth Regulation*. 22(3): 259–271.
- Tian, H., Lv, B., Ding, T., Bai, M. y Ding, Z. 2018. Auxin-BR Interaction Regulates Plant Growth and Development. *Frontiers in Plant Science*. 8: 2256.
- Verma, A., Malik, C. P. y Gupta, V. K. 2012. *In Vitro* Effects of Brassinosteroids on the Growth and Antioxidant Enzyme Activities in Groundnut. *ISRN Agronomy*. 356485.
- Versieux, L. M. y Wendt, T. (2007). Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil. *Biodiversity and Conservation*. 16(11): 2989-3009.
- Walco S.A. 1997. Quelatación: La Teoría de los Ligandos. Todo sobre los quelatos. [https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home\\_4/mod\\_virtuales/modulo2/6.pdf](https://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_4/mod_virtuales/modulo2/6.pdf). Consultado el 1 de noviembre de 2022.
- World Flora Online (WFO). 2024. *Tillandsia imperialis* E. Morren ex Roetzl. World Flora Online. <https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000579802>. Consultado el 24 de marzo de 2023.

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Test de distribución normal para número de brotes.

Tests for normal distribution

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
N	14	18	18	9	8	10	6	7	9
Shapiro-Wilk W	0.9674	0.9738	0.9258	0.7728	0.6991	0.9581	0.8057	0.8399	0.8087
p(normal)	0.8404	0.8646	0.1637	0.009959	0.002198	0.7637	0.06604	0.09911	0.02565
Anderson-Darling A	0.2462	0.2618	0.551	0.928	1.103	0.19	0.5585	0.5074	0.7629
p(normal)	0.7041	0.6626	0.1333	0.01033	0.003062	0.8648	0.08339	0.1276	0.02923
p(Monte Carlo)	0.7243	0.6917	0.1395	0.0114	0.0023	0.8859	0.0841	0.1424	0.0301
Lilliefors L	0.1658	0.1269	0.1776	0.3221	0.3503	0.1508	0.296	0.2323	0.2859
p(normal)	0.3638	0.6129	0.134	0.008437	0.004709	0.7432	0.1001	0.3019	0.03257
p(Monte Carlo)	0.3707	0.6086	0.1368	0.0089	0.0045	0.7458	0.1101	0.3186	0.0331
Jarque-Bera JB	0.7418	0.2928	1.156	1.635	2.941	0.4778	0.7966	0.8627	1.948
p(normal)	0.6901	0.8638	0.5611	0.4416	0.2298	0.7875	0.6715	0.6496	0.3775
p(Monte Carlo)	0.5211	0.8483	0.3262	0.0838	0.0271	0.7076	0.2206	0.2293	0.0663

### Anexo 2. Prueba de Kruskal-Wallis para número de brotes.

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

#### Kruskal-Wallis test for equal medians

$H(chi^2)$ :	34.42
$H_c$ (tie corrected):	34.99
$p$ (same):	2.681E-05

There is a significant difference between sample medians

### Anexo 3. Prueba de Dunn's post hoc para número de brotes.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc			
Raw p values, uncorrected significance									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
T1		0.3501	0.9008	0.0242	0.001311	0.2198	0.01792	0.08065	0.007496
T2	0.3501		0.2576	0.001501	3.544E-05	0.03299	0.001596	0.01038	0.0003016
T3	0.9008	0.2576		0.02445	0.001165	0.2398	0.01847	0.08622	0.007155
T4	0.0242	0.001501	0.02445		0.3425	0.322	0.7155	0.7594	0.7035
T5	0.001311	3.544E-05	0.001165	0.3425		0.05341	0.6182	0.2343	0.5619
T6	0.2198	0.03299	0.2398	0.322	0.05341		0.2102	0.5418	0.1673
T7	0.01792	0.001596	0.01847	0.7155	0.6182	0.2102		0.5335	0.9808
T8	0.08065	0.01038	0.08622	0.7594	0.2343	0.5418	0.5335		0.5078
T9	0.007496	0.0003016	0.007155	0.7035	0.5619	0.1673	0.9808	0.5078	

## Anexo 4. Test de distribución normal para número de raíces.

Tests for normal distribution

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>N</b>	8	11	11	17	17	18	17	16	20
<b>Shapiro-Wilk W</b>	0.7269	0.7995	0.734	0.9719	0.8731	0.9581	0.9397	0.8323	0.9142
<b>p(normal)</b>	0.004523	0.009252	0.001287	0.851	0.02459	0.5651	0.3143	0.00755	0.07673
<b>Anderson-Darling A</b>	1.063	0.9621	1.283	0.2993	0.7648	0.2984	0.537	1.159	0.6941
<b>p(normal)</b>	0.003961	0.009511	0.001318	0.544	0.03736	0.5487	0.1438	0.003468	0.05899
<b>p(Monte Carlo)</b>	0.0038	0.0092	0.0018	0.5769	0.0367	0.5761	0.1495	0.0034	0.0575
<b>Lilliefors L</b>	0.375	0.2832	0.3382	0.136	0.2204	0.1382	0.1871	0.2459	0.1736
<b>p(normal)</b>	0.0001	0.01463	0.0001	0.5422	0.02723	0.4731	0.1114	0.01103	0.1121
<b>p(Monte Carlo)</b>	0.0012	0.0133	0.0012	0.546	0.0251	0.4608	0.1112	0.0111	0.1091
<b>Jarque-Bera JB</b>	1.314	0.9748	1.49	0.2118	1.784	0.3636	0.4298	2.521	1.849
<b>p(normal)</b>	0.5183	0.6142	0.4748	0.8995	0.4099	0.8338	0.8066	0.2835	0.3967
<b>p(Monte Carlo)</b>	0.1156	0.3044	0.1259	0.8947	0.1327	0.8023	0.7652	0.0789	0.1415

## Anexo 5. Prueba de Kruskal-Wallis para número de raíces.

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

### Kruskal-Wallis test for equal medians

$H(ch^2)$ :	71.21
$H_c$ (tie corrected):	71.65
$p$ (same):	2.306E-12

There is a significant difference between sample medians

## Anexo 6. Prueba de Dunn's post hoc para número de raíces.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
---------------	---------	------------------	-----------	----------------	-----------------------	-----------------

Raw p values, uncorrected significance

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>T1</b>		0.8581	0.87	0.003747	0.0004738	0.002044	3.061E-05	7.313E-06	3.255E-07
<b>T2</b>	0.8581		0.9869	0.002725	0.0002542	0.001342	1.06E-05	2.079E-06	4.468E-08
<b>T3</b>	0.87	0.9869		0.002567	0.0002369	0.001259	9.752E-06	1.903E-06	4.022E-08
<b>T4</b>	0.003747	0.002725	0.002567		0.456	0.8417	0.1124	0.04478	0.006726
<b>T5</b>	0.0004738	0.0002542	0.0002369	0.456		0.578	0.3997	0.2032	0.05299
<b>T6</b>	0.002044	0.001342	0.001259	0.8417	0.578		0.1584	0.06611	0.01096
<b>T7</b>	3.061E-05	1.06E-05	9.752E-06	0.1124	0.3997	0.1584		0.6576	0.2895
<b>T8</b>	7.313E-06	2.079E-06	1.903E-06	0.04478	0.2032	0.06611	0.6576		0.5609
<b>T9</b>	3.255E-07	4.468E-08	4.022E-08	0.006726	0.05299	0.01096	0.2895	0.5609	

## Anexo 7. Test de distribución normal para longitud de la raíz más larga.

Tests for normal distribution

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
N	8	12	11	17	17	18	17	15	20
Shapiro-Wilk W	0.9345	0.8802	0.8926	0.9587	0.9463	0.9737	0.9214	0.9322	0.9423
p(normal)	0.5578	0.08823	0.1498	0.6075	0.4	0.8636	0.1561	0.2938	0.2651
Anderson-Darling A	0.2589	0.582	0.454	0.3395	0.2903	0.1774	0.4891	0.534	0.4133
p(normal)	0.6054	0.1021	0.2167	0.4554	0.5678	0.9059	0.1923	0.1428	0.3062
p(Monte Carlo)	0.6689	0.1039	0.223	0.4749	0.6029	0.9232	0.1967	0.1479	0.3137
Lilliefors L	0.1588	0.2162	0.1651	0.1582	0.1419	0.123	0.1629	0.2161	0.1418
p(normal)	0.797	0.1209	0.5412	0.3028	0.473	0.6617	0.2618	0.05551	0.3543
p(Monte Carlo)	0.7919	0.1284	0.5477	0.3002	0.4758	0.661	0.2582	0.0563	0.347
Jarque-Bera JB	0.7286	1.033	1.076	0.9111	1.022	0.5878	1.07	1.278	0.9783
p(normal)	0.6947	0.5965	0.584	0.6341	0.6	0.7454	0.5858	0.5279	0.6131
p(Monte Carlo)	0.4044	0.2892	0.2501	0.4424	0.3774	0.6632	0.353	0.2377	0.4275

## Anexo 8. Prueba de ANOVA para longitud de la raíz más larga.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
<b>Test for equal means</b>						
	<b>Sum of sqrs</b>	<b>df</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>	
<b>Between groups:</b>	21.0953	8	2.63691	5.686	3.591E-06	
<b>Within groups:</b>	58.43	126	0.46373		<b>Permutation p (n=99999)</b>	
<b>Total:</b>	79.5253	134			1E-05	
<b>Components of variance (only for random effects):</b>						
<b>Var(group):</b>	0.14596	<b>Var(error):</b>	0.46373	<b>ICC:</b>	0.239401	
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0.2173					
<b>Levene's test for homogeneity of variance, from means</b>				<b>p (same):</b>	0.2221	
<b>Levene's test, from medians</b>				<b>p (same):</b>	0.4146	
<b>Welch F test in the case of unequal variances: F=5.906, df=46.54, p=3.219E-05</b>						

## Anexo 9. Prueba Tukey's pairwise para longitud de la raíz más larga.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc			
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.									
Copenhaver-Holland 1988									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
T1		0.3654	0.7832	0.03377	0.005304	0.2587	0.0004934	0.1136	9.784E-06
T2	3.217		0.9991	0.9861	0.7774	1	0.3093	0.9998	0.02633
T3	2.314	0.9423		0.7547	0.3368	0.9979	0.07077	0.9507	0.003045
T4	4.658	1.402	2.383		0.9984	0.9766	0.846	0.9999	0.1951
T5	5.472	2.328	3.285	1.018		0.6778	0.9968	0.9612	0.6444
T6	3.488	0.03658	1.063	1.523	2.555		0.1912	0.9997	0.007562
T7	6.373	3.353	4.283	2.144	1.127	3.697		0.5865	0.9824
T8	4.019	0.7524	1.725	0.6697	1.655	0.7945	2.746		0.07494
T9	7.679	4.776	5.694	3.684	2.626	5.326	1.454	4.253	

## Anexo 10. Test de distribución normal para longitud total de la plántula.

Tests for normal distribution

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
N	18	19	20	20	20	20	20	20	19
Shapiro-Wilk W	0.9547	0.9343	0.9387	0.9436	0.9181	0.9738	0.9698	0.95	0.9239
p(normal)	0.5038	0.2081	0.2271	0.2807	0.09119	0.8318	0.751	0.3669	0.1337
Anderson-Darling A	0.3629	0.4638	0.3406	0.3873	0.5664	0.2031	0.1676	0.3896	0.653
p(normal)	0.4023	0.2271	0.4599	0.3549	0.1235	0.8566	0.9252	0.3502	0.07455
p(Monte Carlo)	0.421	0.2306	0.4622	0.3715	0.1296	0.8648	0.9471	0.3611	0.0783
Lilliefors L	0.1744	0.1468	0.1089	0.1327	0.1959	0.103	0.07328	0.1344	0.211
p(normal)	0.151	0.338	0.7668	0.4604	0.04146	0.8345	204.1	0.4399	0.02535
p(Monte Carlo)	0.1522	0.3382	0.7631	0.4525	0.0424	0.8308	0.9952	0.4378	0.025
Jarque-Bera JB	0.3586	0.952	2.748	1.042	1.964	0.9117	0.7173	1.162	1.32
p(normal)	0.8359	0.6213	0.253	0.5939	0.3746	0.6339	0.6986	0.5594	0.5167
p(Monte Carlo)	0.8109	0.4334	0.0772	0.402	0.1283	0.4668	0.5843	0.3439	0.2654

## Anexo 11. Prueba de ANOVA para longitud total de la plántula.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
<b>Test for equal means</b>						
	<b>Sum of sqrs</b>	<b>df</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>	
<b>Between groups:</b>	28.6816	8	3.58521	10.87	2.83E-12	
<b>Within groups:</b>	55.0883	167	0.32987		<b>Permutation p (n=99999)</b>	
<b>Total:</b>	83.7699	175			1E-05	
<b>Components of variance (only for random effects):</b>						
<b>Var(group):</b>	0.166492	<b>Var(error):</b>	0.32987	<b>ICC:</b>	0.335424	
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0.3097					
<b>Levene's test for homogeneity of variance, from means</b>				<b>p (same):</b>	1.299E-06	
<b>Levene's test, from medians</b>				<b>p (same):</b>	4.948E-06	
<b>Welch F test in the case of unequal variances: F=37.06, df=69.06, p=4.507E-22</b>						

## Anexo 12. Prueba Tukey's pairwise para longitud total de la plántula.

Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc			
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.									
Copenhaver-Holland 1988									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<b>T1</b>		0.9503	0.06126	1.975E-06	1.162E-06	2.309E-05	4.243E-05	8.452E-06	1.927E-09
<b>T2</b>	1.73		0.6436	0.0004001	0.0002539	0.003135	0.005136	0.001366	7.935E-07
<b>T3</b>	4.342	2.627		0.1588	0.1224	0.4382	0.5319	0.3017	0.002123
<b>T4</b>	8.047	6.385	3.807		1	0.9998	0.9991	1	0.8826
<b>T5</b>	8.2	6.54	3.964	0.1567		0.9993	0.9972	1	0.9223
<b>T6</b>	7.312	5.639	3.052	0.7552	0.912		1	1	0.5718
<b>T7</b>	7.122	5.447	2.856	0.9504	1.107	0.1952		1	0.4779
<b>T8</b>	7.619	5.95	3.366	0.4404	0.5972	0.3148	0.51		0.7193
<b>T9</b>	9.925	8.309	5.787	2.029	1.875	2.775	2.968	2.464	

### Anexo 13. Test de distribución normal para biomasa.

Tests for normal distribution

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
N	20	20	20	20	19	20	20	20	20
Shapiro-Wilk W	0.9438	0.9663	0.9819	0.9258	0.9595	0.9685	0.9143	0.9371	0.9671
p(normal)	0.2824	0.6759	0.9565	0.1283	0.5633	0.7236	0.07713	0.2113	0.6927
Anderson-Darling A	0.3755	0.2574	0.1847	0.6598	0.2564	0.3203	0.5911	0.5009	0.2835
p(normal)	0.379	0.6829	0.8952	0.07233	0.6841	0.5085	0.1087	0.1836	0.5951
p(Monte Carlo)	0.3893	0.7074	0.9098	0.0751	0.7166	0.5227	0.1103	0.1895	0.628
Lilliefors L	0.1407	0.1288	0.1099	0.1669	0.1148	0.1417	0.1521	0.1304	0.1331
p(normal)	0.3667	0.5099	0.7548	0.147	0.7263	0.3562	0.254	0.4888	0.4555
p(Monte Carlo)	0.3666	0.5166	0.7486	0.1459	0.7164	0.357	0.247	0.4873	0.4517
Jarque-Bera JB	1.598	0.8443	0.2619	2.427	0.999	0.06326	2.775	0.6922	0.065
p(normal)	0.4497	0.6556	0.8773	0.2971	0.6068	0.9689	0.2497	0.7074	0.968
p(Monte Carlo)	0.1904	0.5168	0.8675	0.0918	0.4034	0.9727	0.0809	0.6013	0.9706

### Anexo 14. Prueba de ANOVA para biomasa.

Several-sample tests

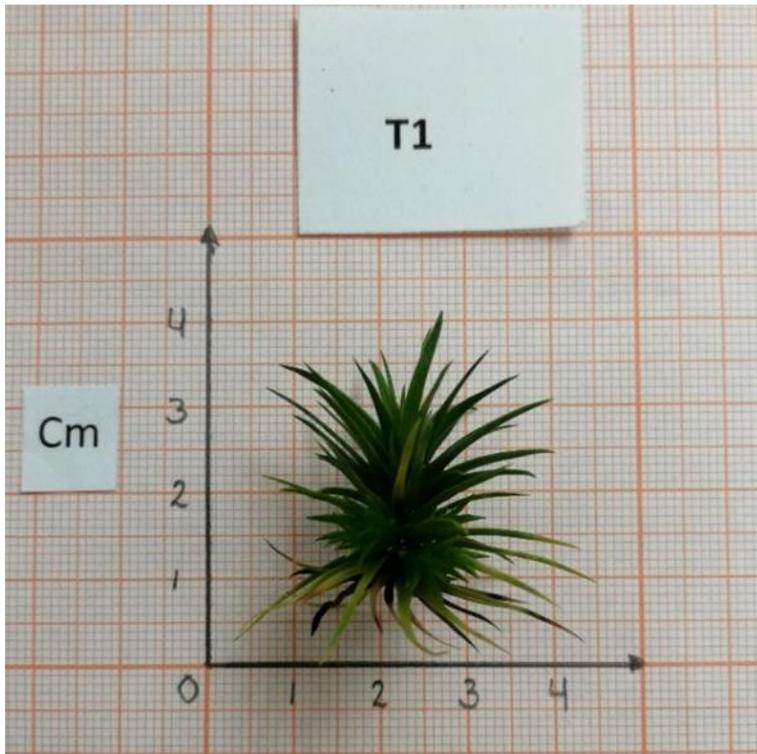
One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc
<b>Test for equal means</b>						
	<b>Sum of sqrs</b>	<b>df</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>	
<b>Between groups:</b>	0.928097	8	0.116012	10.36	8.984E-12	
<b>Within groups:</b>	1.90277	170	0.0111928		<b>Permutation p (n=99999)</b>	
<b>Total:</b>	2.83087	178			1E-05	
<b>Components of variance (only for random effects):</b>						
<b>Var(group):</b>	0.00527041	<b>Var(error):</b>	0.0111928	<b>ICC:</b>	0.320133	
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0.2951					
<b>Levene's test for homogeneity of variance, from means</b>				<b>p (same):</b>	2.745E-06	
<b>Levene's test, from medians</b>				<b>p (same):</b>	1.856E-05	
<b>Welch F test in the case of unequal variances: F=17.04, df=70.65, p=8.394E-14</b>						

### Anexo 15. Prueba Tukey's pairwise para biomasa.

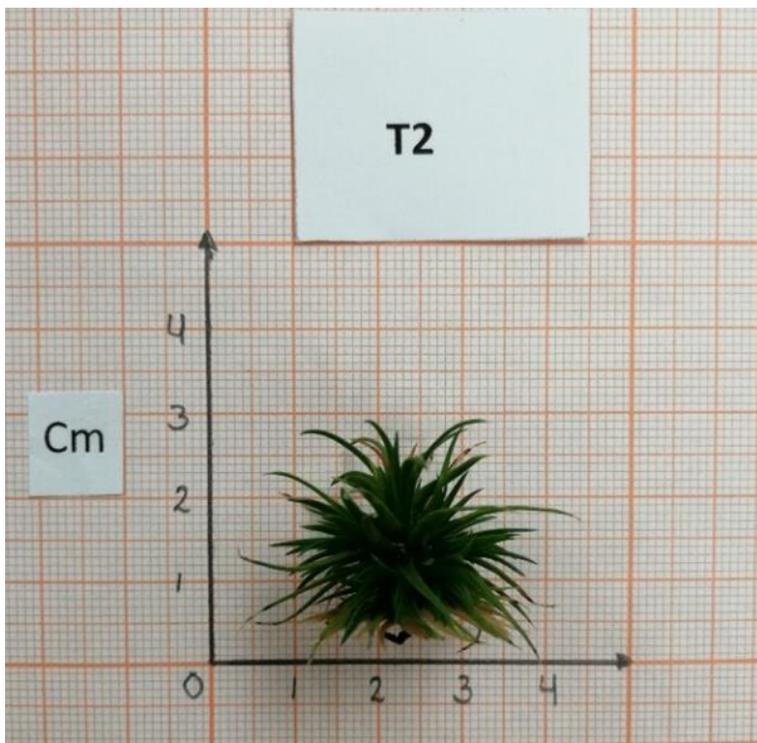
Several-sample tests

One-way ANOVA	Effects	Tukey's pairwise	Residuals	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney pairwise	Dunn's post hoc			
Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.									
Copenhaver-Holland 1988									
T1	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
		0.411	0.2108	0.02383	0.9956	0.5126	0.08036	0.0005034	1.142E-11
	3.11		1	0.9572	0.9193	1	0.9975	0.3742	1.78E-06
	3.623	0.513		0.9958	0.7499	0.9999	1	0.6185	1.015E-05
	4.796	1.686	1.173		0.2338	0.9166	1	0.9783	0.0003962
	1.182	1.888	2.395	3.552		0.9585	0.4804	0.01373	2.424E-09
	2.896	0.2142	0.7271	1.9	1.677		0.9915	0.2861	8.411E-07
	4.198	1.088	0.5753	0.5976	2.963	1.302		0.8599	6.498E-05
	6.302	3.192	2.679	1.506	5.039	3.406	2.104		0.01983
	11.18	8.071	7.558	6.385	9.855	8.285	6.982	4.879	

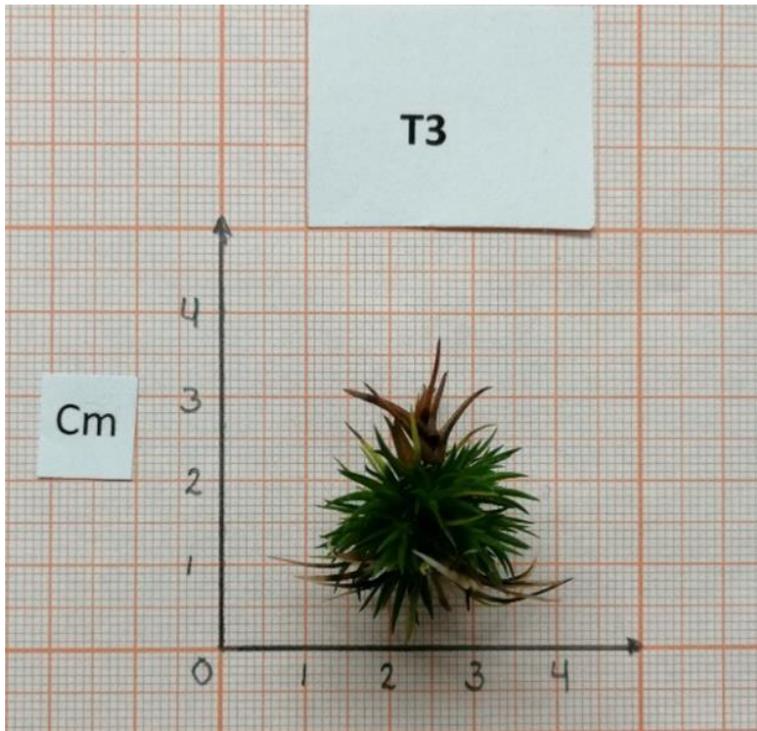
Anexo 16. Individuo del T1.



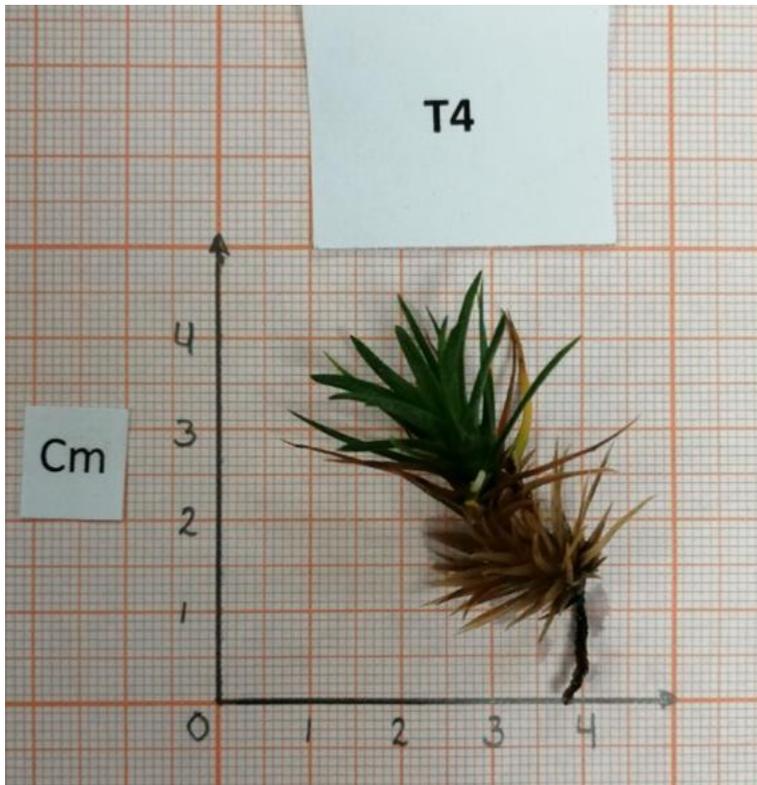
Anexo 17. Individuo del T2.



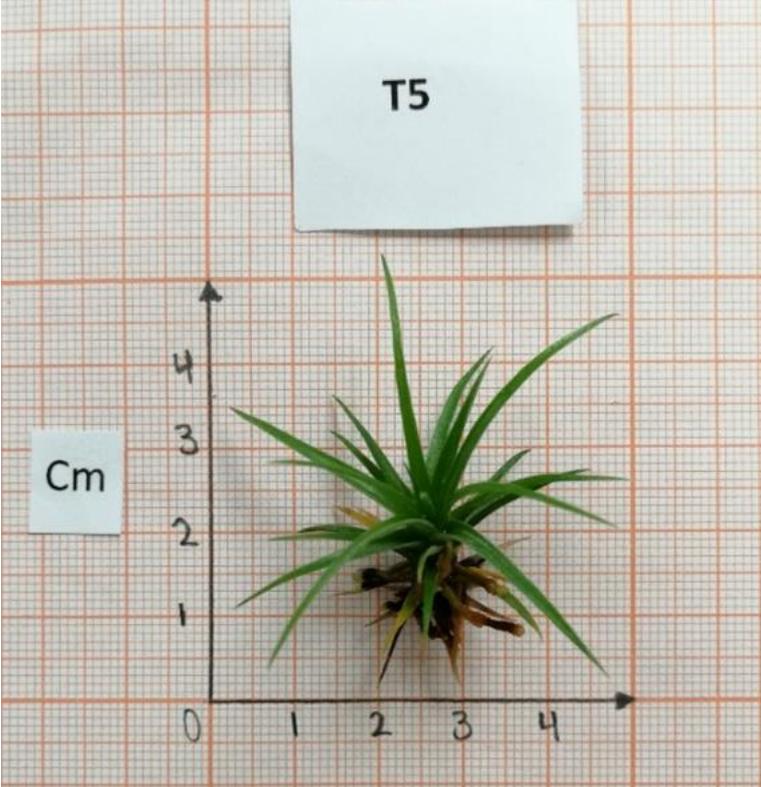
Anexo 18. Individuo del T3.



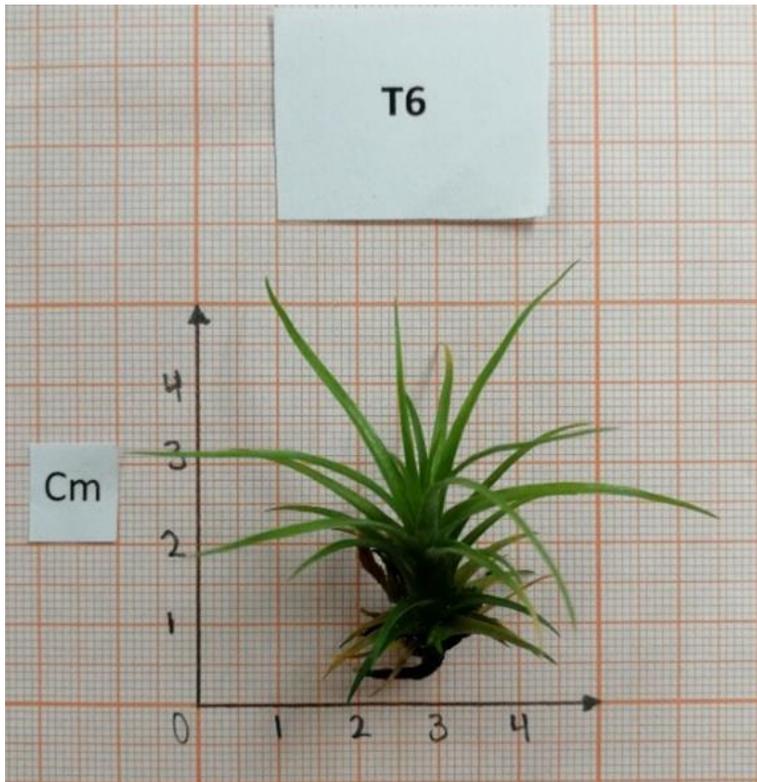
Anexo 19. Individuo del T4.



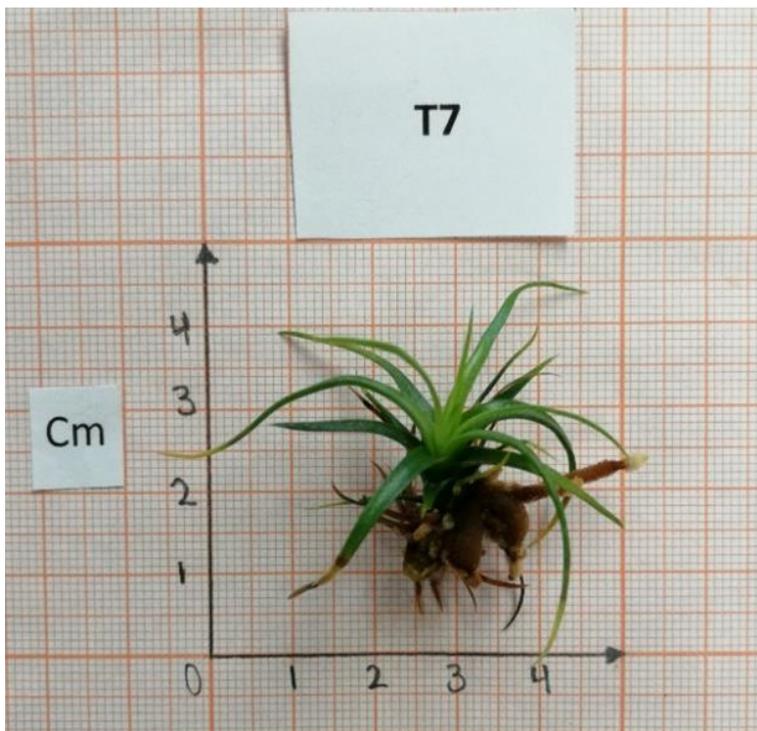
Anexo 20. Individuo del T5.



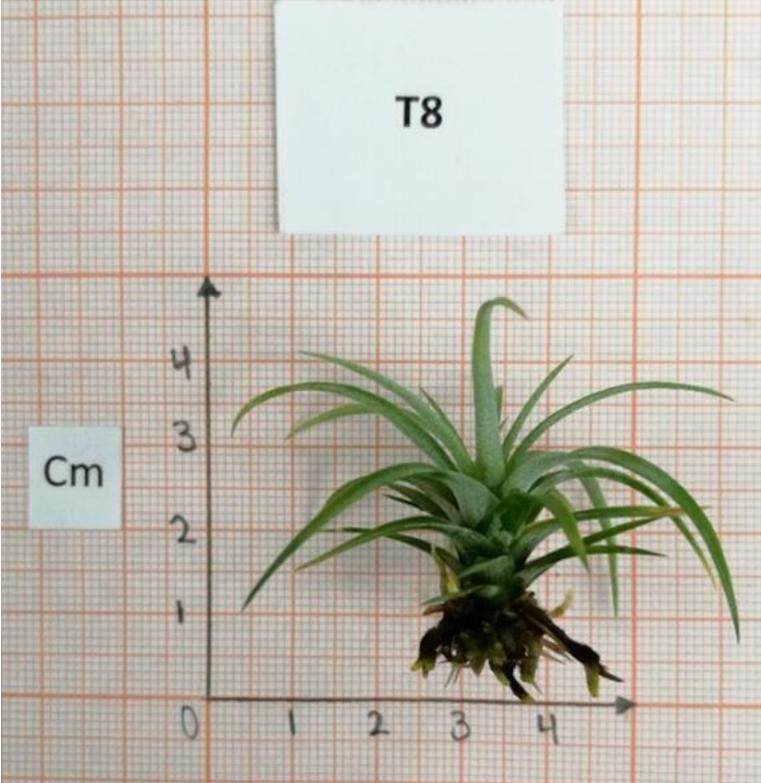
Anexo 21. Individuo del T6.



Anexo 22. Individuo del T7.



Anexo 23. Individuo del T8.



Anexo 24. Individuo del T9.

