



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

“ALTERNATIVA DE USO DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL CULTIVO *in vitro* EN *Tillandsia ionantha* Planch.”

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERIA AMBIENTAL

PRESENTA

ING. AGR. XARENI VÁZQUEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS

DR. HUMBERTO MATA ALEJANDRO

CODIRECTORA DE TESIS

DRA. EDNA FABIOLA VALDEZ HERNÁNDEZ

ASESORES

DRA. MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ

DRA. ISABEL ARACELI AMARO ESPEJO

FEBRERO 2024

BOCA DEL RÍO, VERACRUZ, MÉXICO





Boca del Río, Ver **25/ENERO/2024**

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

XARENI VÁZQUEZ FLORES
PASANTE DEL PROGRAMA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL
PRESENTE

De acuerdo con el fallo emitido por los integrantes del Comité Revisor de la TESIS PARA OBTENCIÓN DE GRADO, desarrollada por usted cuyo título es:

“ALTERNATIVA DE USO DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL CULTIVO in vitro EN Tillandsia ionantha Planch.”

Esta División de Estudios de Posgrado e Investigación le concede **AUTORIZACIÓN** para que proceda a su impresión.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos

DR. JUAN DAVID GARAY MARIN
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Coordinación del Programa MCIAMB
c.c.p. Expediente





ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Número Registro: A-01516-080822

En la ciudad de Boca del Río, Ver., siendo las 10:00 horas del día 26 del mes de enero de 2024 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Consejo del Posgrado de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental del ITBOCA, para examinar la Tesis de Grado titulada: Alternativa de uso de quitosano y nanopartículas de plata en el cultivo *in vitro* en *Tillandsia ionantha* Planch.

Que presenta el (la) alumno(a):

XARENI VÁZQUEZ FLORES

Aspirante al Grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Después de escuchar las opiniones sobre el documento escrito e intercambiar puntos de vista, los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para su defensa ante el jurado correspondiente.

LA COMISIÓN REVISORA:

DR. HUMBERTO MATA ALEJANDRO
Director

DRA. EDNA FABIOLA VALDEZ HERNÁNDEZ
Co-Director

DRA. MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ
Asesor

DRA. ISABEL ARACELI AMARO ESPEJO
Asesor





Boca del Río, Ver., **26/ENERO/2024**
Asunto: **CONSTANCIA DE
NO INCONVENIENCIA**

ING. VICTOR HUGO MUÑOZ ROBLEDO
JEFE DEL DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
Presente.

AT´N.LIC. SONIA CONCEPCIÓN SOLÍS SOLÍS
GESTOR DE TITULACIÓN
Presente.

Por medio del presente, me permito hacer constar que el(a) candidato(a) a Maestro en Ciencias en Ingeniería Ambiental **C. XARENI VÁZQUEZ FLORES**, de la generación agosto 2021 – diciembre 2023 con número de control **22990011**, cumplió con todos los requisitos para su liberación como tesista, mismos que incluyen la presentación del manuscrito final de tesis autorizado por su director de tesis **DR. HUMBERTO MATA ALEJANDRO** y él envió del artículo derivado de su tesis de grado a una revista indexada.

Por lo anterior no tengo inconveniente en que realice los trámites correspondientes para el acto recepcional para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, en la fecha y hora que defina el candidato con su Director de tesis.

Sin otro particular y para los fines legales que corresponda, quedo de usted.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica®
Por nuestros mares responderemos*

DR. JUAN DAVID GARAY MARIN
**JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIO DE
POSGRADO E INVESTIGACION**

Vo.Bo.

DR. HUMBERTO MATA ALEJANDRO
DIRECTOR DE TESIS

c.c.p. Coordinador de MCIAMB
c.c.p. Expediente





Boca del Río, Veracruz, **16/febrero/2024**

Asunto: **CESION DE DERECHOS Y NO PLAGIO**

H. CONSEJO DE POSGRADO

**PROGRAMA DE POSGRADO MAESTRIA EN CIENCIAS EN INGENIERIA AMBIENTAL
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO/ INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO
PRESENTE**

En la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los 16 días del mes febrero de 2024. La que suscribe Xareni Vázquez Flores por mi propio derecho y en calidad de autor de la tesis titulada: "ALTERNATIVA DE USO DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL CULTIVO *in vitro* EN *Tillandsia ionantha* Planch." (en lo sucesivo la "TESIS") manifiesto que cedo a título gratuito la totalidad de los derechos patrimoniales de autor que sobre ella me corresponden, a favor del Tecnológico Nacional de México (en lo sucesivo el "TecNM"). Lo anterior en términos de los antecedentes y consideraciones siguientes:

- I. Que la presente cesión de derechos de la "TESIS" se transfiera en virtud de lo estipulado en los establecido en los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, sin reservarme acción legal de ningún tipo.
- II. Manifiesto bajo protesta de decir verdad, que la "TESIS" es original, inédita y propia, no existiendo impedimento de ninguna naturaleza para la cesión de derechos que se está haciendo, respondiendo además por cualquier acción de reivindicación, plagio u otra clase de reclamación que al respecto pudiera sobrevenir.
- III. Que la titularidad de derechos de autor de la "TESIS" en términos del artículo 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor (reproducción, en todas sus modalidades, transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de explotación que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer, son propiedad única y exclusiva del "TecNM", adquiriendo el derecho de reproducción en todas sus modalidades, el derecho de transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de uso que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer. La cesión de derechos se realiza con carácter permanente e irrevocable.
- IV. El TecNM podrá exhibir la "TESIS" a través de cualquier medio, en cualquier parte del mundo, incluso ser modificada, comprendida, traducida y de cualquier forma explotada en su totalidad o parcialidad.





- V. Que no he otorgado, ni otorgaré por ningún motivo, consentimiento alguno para la utilización de la “TESIS” por cualquier medio y su materialización en productos o servicios de cualquier naturaleza, a favor de ninguna persona física o moral, distinta a el “TecNM”.
- VI. Estoy enterado del contenido y alcance legal de la presente cesión de derechos, firmando al final del presente documento para su certificación.

Señalo como correo electrónico para recibir futuras notificaciones: m22990011@bdelrio.tecnm.mx.

Agradeciendo de antemano sus atenciones, le envío un cordial saludo

ATENTAMENTE

Xareni Vázquez Flores

NOMBRE Y FIRMA DEL ESTUDIANTE DE MAESTRIA

c.c.p. Archivo



Dedicatoria

Para Arcelia, mi madre, por su amor y apoyo incondicional.

A mis abuelos Rogelio † y Arcelia por cuidar de mí.

A Pedro Miguel, la mejor de las coincidencias 

Un amigo fiel es un apoyo seguro,
el que lo encuentra, encuentra un tesoro.

(Eclesiástico 6:14)

Luis Enrique, Mara y Mercedes mis grandes amigos, a los que tanto quiero y
admiro.

Bibi † y Estrellita †, las extraño siempre.

Agradecimiento

A mi comité: Dr. Humberto Mata Alejandro, Dra. Edna Fabiola Valdez Hernández, Dra. María del Refugio Castañeda Chávez, Dra. Isabel Araceli Amaro agradecida de poder aprender de investigadores como ustedes.

A todos los profesores del posgrado de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental que contribuyeron en mi formación.

A la Dra. Fabiola Lango Reynoso, coordinadora de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental y Dr. Juan David Garay Marín, jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación por su excelente trato y por todas las facilidades prestadas hacia mi persona.

A mis compañeros Faby, Misa, Andy, Luz, Jorge personas de gran corazón.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) que mediante su financiamiento me fue posible estudiar esta maestría.

Al Tecnológico Nacional de México que a través del Tecnológico de Boca del Río me brindó la oportunidad de acercarme a la ciencia con un posgrado tan bonito como este.

Al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad de hacer una estancia en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, a la Dra. Edna Fabiola Valdez Hernández y al técnico laboratorista Gisela García de la Rosa muchas gracias por compartir conmigo sus conocimientos del cultivo *in vitro* y facilitar mi estadía.

A mi país, y a los mexicanos que hacen posible que personas como yo podamos acceder a la educación pública de calidad.

RESUMEN

La revalorización y aplicación de subproductos de la industria camaronera, así como los nuevos materiales que brinda la nanotecnología generan la oportunidad de emplear agentes como el quitosano y las nanopartículas de plata (NPsAg) para aplicarlas en el cultivo *in vitro* de plantas como *Tillandsia ionantha* Planch. que son extraídas de su medio sin control y que carecen de medios estandarizados de producción para su comercialización y conservación. En el presente trabajo de investigación se plantearon los objetivos de analizar si la aplicación de quitosano y NPsAg en el cultivo *in vitro* de *T. ionantha* Planch. benefician la germinación y la inocuidad del cultivo; se propuso un protocolo para aplicar la prueba de viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas considerando pretratamiento de las semillas por medio de remojo, escarificación física, así como diferentes concentraciones de tetrazolio, se comparó la efectividad del quitosano con dos fuentes comerciales, el grado alimenticio y grado reactivo sobre la germinación y contaminación de semillas bajo sistema *in vitro*, se determinó la concentración y tiempo óptimo de exposición de las semillas a las NPsAg dentro del proceso de lavado y desinfección previo a la siembra *in vitro* así como al medio de cultivo líquido y su efecto en la germinación y control sanitario bajo condiciones *in vitro*. El remojo por 12 horas y la aplicación de tetrazolio al 0.1 % fue suficiente para llevar a cabo una adecuada prueba de viabilidad, la aplicación de quitosano grado alimenticio o reactivo en el medio de cultivo no tuvo efecto significativo en germinación, contaminación y supervivencia de las semillas pero si confirieron mejores características estéticas, finalmente la adición de NPsAg al medio de cultivo sin esterilizar no presentó contaminación en ninguna de las dosis empleadas y su presencia en el medio de cultivo no tuvo efecto en porcentaje de germinación, días a germinación, contaminación ni sobrevivencia. Tanto el quitosano como las NPsAg son viables de implementarse en el cultivo *in vitro* de *T. ionantha* Planch. sin embargo, se requieren más pruebas para determinar con precisión las dosis específicas para esta especie.

Palabras clave: Germinación, subproducto, contaminación, conservación, bromelia.

ABSTRACT

The revaluation and application of by-products from the shrimp industry, as well as the new materials provided by nanotechnology, create the opportunity to use agents such as chitosan and silver nanoparticles (NPsAg) and apply them in the *in vitro* cultivation of plants like *T. ionantha* Planch. These plants are extracted from their natural environment without control and lack standardized production methods for commercialization and preservation. In this research, the objectives were set to analyze whether the application of chitosan and NPsAg in the *in vitro* cultivation of *T. ionantha* Planch. benefits germination and the safety of the cultivation. A protocol was proposed to apply the topographic viability test of tetrazolium in seeds, considering seed pre-treatment through soaking, physical scarification, as well as different concentrations of tetrazolium. The effectiveness of chitosan was compared with two commercial sources, food-grade and reactive-grade, regarding germination and seed contamination under an *in vitro* system. The concentration and optimal exposure time of seeds to NPsAg were determined during the washing and disinfection process prior to *in vitro* sowing, as well as their effect on germination and sanitary control under *in vitro* conditions. Soaking for 12 hours and the application of 0.1% tetrazolium were sufficient to carry out an adequate viability test. The application of food-grade or reactive-grade chitosan in the culture medium had no significant effect on germination, contamination, and seed survival, but it did confer better aesthetic characteristics. Finally, the addition of NPsAg to the unsterilized culture medium did not result in contamination at any of the doses used, and its presence in the culture medium had no effect on germination percentage, days to germination, contamination, or survival. Both chitosan and NPsAg are viable for implementation in the *in vitro* cultivation of *T. ionantha* Planch. However, further tests are required to accurately determine the specific doses for this species.

Keywords: Germination, byproduct, contamination, conservation, bromeliad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	4
2.1 Deforestación.....	4
2.2 Tráfico ilegal de especies vegetales silvestres.....	4
2.3 Residuos de crustáceos y su impacto al medio ambiente.....	5
2.4 Quitina.....	7
2.5 Quitosano.....	8
2.6 Nanopartículas de plata	15
2.7 Contaminación microbiana en la micropropagación.....	18
2.8 Familia Bromeliaceae.....	18
2.9 <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.	19
2.10 Cultivo <i>in vitro</i>	21
2.11 Totipotencia	21
2.12 Embriogénesis somática	23
2.13 Organogénesis.....	24
2.14 Medio de cultivo	25
2.15 Conservación <i>ex situ</i>	26
2.16 Conservación <i>in vitro</i>	27
2.17 Germinación.....	28
2.18 Prueba de tetrazolio	29
III. MARCO DE REFERENCIA	31
3.1 Antecedentes	31
IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	34
4.1. Situación Problemática	34
4.2. Delimitación del problema.....	35
4.3. Planteamiento del problema	36

4.4. Vacío del conocimiento	36
4.5. Frontera del conocimiento.....	37
4.6 Justificación	37
4.7 Pregunta de investigación.....	39
V. HIPÓTESIS	40
VI. OBJETIVOS.....	40
6.1 General	40
6.2 Particulares	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	41
7.1 Lugar de estudio	41
7.2 Material vegetal.....	42
7.3 Manejo de semilla	42
7.4 Medio de cultivo	43
7.5 Condiciones de incubación	44
7.6 Tratamientos	44
7.7 Diseño experimental	47
7.8 Variables respuesta.....	48
7.9 Análisis estadístico.....	48
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
8.1 Viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.	49
8.2 Análisis de la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo.....	54
8.3 Evaluación del efecto de las NPsAg en el proceso de lavado y desinfección previo a la siembra <i>in vitro</i>	58
8.4 Efecto de las NPsAg en el medio de cultivo líquido <i>in vitro</i> en semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.	61
IX. CONCLUSIONES	64
X. RECOMENDACIONES	65
XI. REFERENCIAS	66
APÉNDICE 1	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Proporción de quitina en crustáceos en la masa corporal fresca total de algunos órdenes.....	6
Cuadro 2. Composición aproximada en porcentaje de base seca de desechos de conchas de crustáceos.....	7
Cuadro 3. Tratamientos aplicados a las semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. establecidos en el ensayo para la prueba de tetrazolio.....	45
Cuadro 4. Tratamientos aplicados a las semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch....	45
Cuadro 5. Tratamientos de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y tiempos de inmersión, en semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.....	46
Cuadro 6. Tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. para evaluar las nanopartículas de plata (NPsAg) en el medio de cultivo.....	47
Cuadro 7. Análisis de varianza en los cinco tratamientos aplicados a semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.....	55
Cuadro 8. Respuestas observadas en los cinco tratamientos aplicados a semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.....	58
Cuadro 9. Respuestas de los tratamientos aplicados a semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina. Obtenido de Yadav et al. (2023).	8
Figura 2. Estructura química del quitosano. Obtenido de Yadav et al. (2023).	9
Figura 3. Desacetilación química de quitina. Modificada a partir de Yadav et al. 2023.	10
Figura 4. a) Nanopartículas de plata (NPsAg) aplicadas como desinfectante de explantes, b) Nanopartículas de plata (NPsAg) aplicada al medio de cultivo. Modificada de a partir de Tung et al. 2021.	17
Figura 5. Registro nacional de bromeliáceas. Obtenido de Espejo y López, (2018).	19
Figura 6. Ejemplares vivos de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. var. <i>ionantha</i> (A y B) <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. var. <i>ionantha</i> , Jalcomulco, Veracruz; (C) El Higo, Veracruz; (D) Santa Fe, Tamaulipas; (E y F) Acazónica, Veracruz. Obtenido de Ancora (2021).....	20
Figura 7. Etapas del cultivo in vitro a) Selección de la especie; b) establecimiento del medio de cultivo, c) desarrollo del tejido; e) enraizamiento y acondicionamiento o aclimatación. Modificada a partir de Kapali, (2023).....	21
Figura 8. Tipos de cultivos de tejidos generados a partir de la capacidad de las células vegetales de generar nuevas plantas. Modificada a partir de Bhojwani y Dantu, 2013.....	22
Figura 9. Embriogénesis somática, ejemplos de procesos de embriogénesis somática en diferentes especies. a) Embriogénesis somática en una hoja de <i>Coffea canephora</i> . b) Masa embriogénica de <i>Cocus nucifera</i> . c) Diferentes etapas de desarrollo del genoma AAB de <i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i> , subgrupo Plátano. d) Masa embriogénica de <i>Agave tequilana</i> . (Obtenida de Loyola y Ochoa, 2016).....	23
Figura 10. Fases del proceso de organogénesis. Modificada a partir de Davey, 2017.	24
Figura 11. Situación problemática.	35
Figura 12. Localización geográfica del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma. Elaboración propia.....	41
Figura 13. Grafica de efectos principales de la tinción de semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. para los factores dosis de tetrazolio, escarificación física y remojo. TZ=Tetrazolio, EsF=Escarificación física, Rm= Remojo	50
Figura 14. Patrón de tinción de semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. en los diferentes tratamientos. a) T1: Tetrazolio 0.1 N, con escarificación física, y remojo; b) T2: Tetrazolio 0.5 N, con escarificación física, y remojo; c) Tetrazolio 1 N, con escarificación física, y remojo; d) Tetrazolio 0.1 N, sin escarificación física, y remojo; e) Tetrazolio 0.5 N, sin escarificación física, y remojo; f) Tetrazolio 1 N, sin escarificación física, y remojo; g) Tetrazolio 0.1 N, con escarificación física, sin remojo; h) Tetrazolio 0.5 N, con escarificación física, sin remojo; i) Tetrazolio 1 N, con escarificación física, sin remojo; j) Tetrazolio 0.1 N, sin escarificación física, sin	

remojo; k) Tetrazolio 0.5 N, sin escarificación física, sin remojo; l) Tetrazolio 1 N, sin escarificación física, sin remojo.	51
Figura 15. Patrón de tinción por tetrazolio en semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch.	52
Figura 16. Porcentajes de germinación, contaminación y supervivencia.	55
Figura 17. Comparación visual de plantas testigo. a) Tratamiento testigo (T0) cuyo medio de cultivo no contuvo quitosano en ninguna de sus modalidades aplicado en semillas <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. a los 184 días después de la siembra.	56
Figura 18. Efecto de la aplicación de quitosano comercial y reactivo al medio de cultivo en semillas <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. a los 184 días después de la siembra. b) T1: quitosano grado alimenticio, 250 mg. L ⁻¹ ; c) T2: quitosano grado alimenticio, 500 mg. L ⁻¹ ; d) T3: quitosano grado reactivo 250 mg. L ⁻¹ ; e) T4: quitosano grado reactivo, 500 mg.L ⁻¹	56
Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de NPsAg en semillas de <i>Tillandsia ionantha</i> Planch. a los 61 días de la siembra a) T0: sin inmersión; b) T1: 25 mg.L ⁻¹ , 5 min; c) T2:25 mg.L ⁻¹ , 20 min; d) T3: 100 mg.L ⁻¹ , 5 min; e)T4 :100 mg.L ⁻¹ , 20 min.	59

I. INTRODUCCIÓN

Se estima que cada año a nivel mundial se producen entre seis y ocho millones toneladas de desechos de crustáceos (Mao et al., 2017), en México de acuerdo con el reporte de la CONAPESCA (2020), durante la temporada de captura nacional de camarón 2019-2020 se registró un volumen de producción de 47 mil 664 toneladas de crustáceo, sin embargo es importante tomar en cuenta que entre el 48-60 % del peso total del camarón no es comestible por tratarse del exoesqueleto, la cabeza y la cola (Cabanillas et al., 2020).

Estos desechos representan un gran problema medioambiental pues terminan depositados la superficie de las playas contaminando y causando mal olor (Nwanna et al., 2004) representan carga económica para la industria porque su eliminación es problemática y costosa (Mármol et al., 2011).

El problema de la generación de residuos en la industria de los crustáceos es como lo mencionan Ovilla et al. (2017), que del total de dichos desperdicios solo el 5 % es empleado para la producción de subproductos como alimento para animales y el resto termina depositado en costas generando graves problemas ambientales, también es importante considerar que estos residuos como lo indican Yan y Chen (2015), son biomateriales valiosos que contiene proteínas, lípidos, pigmentos, carbonato de calcio y quitina.

Tras este escenario es necesario encontrar como lo menciona Velasco (2019), una aplicación a estos desechos que por una parte contribuya a tener una mejor disposición final y por otra que generen ingresos económicos a la industria camaronera; un ejemplo es el quitosano el cual es definido por este mismo autor como un polímero natural derivado del proceso de desacetilación de la quitina y ha sido descrito por autores como Mármol et al. (2011) como biodegradable, de alto peso molecular, de fácil aplicación y ambientalmente amigable, estas características han permitido que el quitosano sea usado en ámbitos tan diversos como en la industria de alimentos y bebidas, tratamiento de aguas, y en la agricultura (Velasco, 2019).

Algunas de las propiedades del quitosano reportadas dentro de la agricultura son el control de enfermedades y plagas, su actuación como regulador del crecimiento, como acelerador de la germinación de las semillas, el vigor de las plantas, y el rendimiento agrícola (Lárez, 2008) estas y otras de sus propiedades perfilan al quitosano como una alternativa viable por implementar en más ámbitos del área de la biotecnología vegetal.

Por su parte la nanotecnología es una disciplina innovadora que ofrece oportunidades alentadoras en una variedad de campos, fertilizantes, protección de cultivos, alimentos, textiles, tecnología, biocombustibles, industrias agroquímicas, compuestos biológicos y cultivo de plantas (Khan et al., 2022); esta disciplina también simplifica el cultivo de tejidos vegetales al favorecer la rápida multiplicación y desarrollo de explantes, mejorar la diversidad genética, generar compuestos bioactivos de mayor calidad (Ruttkay et al., 2017)

Se han reportado aplicaciones de las nanopartículas de plata (NPsAg) como el aumento del índice de germinación de semillas, el potencial de germinación, el tiempo medio de germinación, el índice de vigor de semillas, el peso seco de las plántulas y el peso fresco de las semillas (Kale et al., 2021).

Los beneficios reportados para el quitosano y las NPsAg podrían emplearse en el cultivo *in vitro* y que de acuerdo con lo expresado por Anis y Ahmad (2016), es una alternativa de propagación masiva que permite rescatar, conservar y aprovechar especies que como *T. ionantha* Planch. que se encuentran en estado vulnerable por ser recolectadas de su hábitat natural sin control y que no existe un proceso de cultivo para ellas, por lo que se genera una seria amenaza para las poblaciones silvestres (Mondragón y Villa Guzmán, 2008 citado por Hernández et al., 2018), así mismo este sistema es una alternativa en dado que como mencionan Muraro y Bonato (2006), las bromelias pueden tener dificultades en su medio natural dada la baja capacidad germinativa de sus semillas así también el género *Tillandsia* presenta una alta mortalidad de plántulas y plantas jóvenes (Montes et al., 2012).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es analizar si la aplicación de quitosano y nanopartículas de plata en el cultivo *in vitro* de *T. ionantha* Planch. benefician la germinación y generación de plántulas inocuas, para futuros procesos de micropropagación de la especie.

II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 Deforestación

La deforestación se define como la conversión de los bosques a otro tipo de uso de la tierra en este caso no importa si el cambio fue provocado o no por el hombre FAO (2020), otras causas de la deforestación incluye el sobrepastoreo y los incendios forestales que pueden llegar a inhibir el crecimiento de los árboles (Garciglia, 2014) y está relacionada con la pérdida de biodiversidad y con todos aquellos servicios ambientales que de ellos se derivan además esta pérdida se relaciona también con el calentamiento global (SEMARNAT, 2019).

Estimaciones realizadas bajo la metodología Sistema Satelital de Monitoreo Forestal (SAMOF), basada en la fotointerpretación de imágenes satelitales de mediana, alta y muy alta resolución determinaron que en el periodo 2001-2021 México registró una tasa anual promedio de deforestación de 208 mil 850 ha. por año, en los años 2020 y 2021 la conversión de tierras forestales a praderas representó la principal causa de deforestación bruta con 87.7 y 76.61 % respectivamente seguido de la conversión a tierras de cultivo lo que representó el 9.17 y 20.3 % de deforestación bruta en cada uno de esos años (CONAFOR, 2022).

Las consecuencias de deforestación incluyen la acelerada extinción de la diversidad genética presente en los ecosistemas nativos privación del potencial de beneficios y servicios ambientales que los ecosistemas proporcionan para el bienestar humano que incluye el cambio climático, la perturbación de los ciclos hidrológicos y biogeoquímicos, la introducción de especies foráneas, la desaparición de especies autóctonas y la degradación general de los hábitats (Velázquez et al., 2002).

2.2 Tráfico ilegal de especies vegetales silvestres

Se presenta cuando una especie es extraída de su hábitat natural, transportada y mantenida en cautiverio sin permiso, cazada sin las autorizaciones respectivas, recolectada para fines científicos sin permiso o comercializada sin los documentos que avalen su legal procedencia (Sosa, 2011).

De acuerdo con Naranjo (2009), se cuenta con poca información sobre la extracción ilegal con fines comerciales de recursos vegetales pero se sugiere que su impacto podría ser considerable, en México la extracción de plantas en entornos naturales ha sido una práctica antigua, motivada principalmente por el uso arraigado de especies a las que se les han conferido propiedades medicinales, alimenticias, de ornato, rituales, artesanales o para la obtención de fibra; esta actividad no siempre tiene fines comerciales sino consumo local.

Se considera al comercio ilegal de vida silvestre como una variante de daño ambiental la cual se ve impulsada por factores complejos que incluyen a la cultura y a la socioeconomía así mismo, los lugares lejanos y no vigilados hacen susceptible a la vida silvestre de ser objeto de explotación ilegal así mismo, el monitoreo y la protección del comercio legal contribuye a garantizar su sostenibilidad que es relevante pues sustenta el medio de vida de millones de personas alrededor del mundo (Lavorgna et al., 2020).

2.3 Residuos de crustáceos y su impacto al medio ambiente

Los crustáceos integran uno de los grupos zoológicos de mayor éxito, tanto por el número de especies vivientes registradas (67.829). A los crustáceos se les ubica en el grupo de los artrópodos (término que significa “apéndices articulados”), e incluyen desde las pulgas de agua (*Artemia*) hasta los más conocidos como las langostas, camarones y cangrejos. Algunas de las características que menciona es que son organismos que se pueden encontrar en mares y océanos de la Tierra desde la zona intermareal hasta las profundidades abisales (Simões et al., 2010).

Según estimaciones de la FAO (2020), la producción de pesca de captura marina de crustáceos a nivel mundial del año 2020 ascendió a 5.625 miles de toneladas de peso vivo de las cuales la cantidad de camarón capturado fue de 11.14 millones de toneladas, sin embargo, se debe considerar que de ese volumen hasta el 50 % de la masa es desecho por tratarse de la cabeza, cuerpo y cola, por cual se estima se producen 5.7 millones de toneladas de desechos de camarón (Su et al., 2023).

La mayoría de este tipo de desechos se tiran frecuentemente en vertederos o en el mar, lo que contamina el medio ambiente (Zhou et al., 2021). Dada la fácil proliferación bacteriana producto de la descomposición resulta también potencialmente perjudicial para la salud humana (Ferraro et al., 2010).

Así mismo Yan y Chen (2015), indican que este tipo de desechos se conforman de tres sustancias químicas principales que pueden tener aplicaciones para la industria y son los siguientes:

- Carbonato de calcio (20-50 %): Industrias farmacéuticas, agrícolas, de la construcción y del papel, incluidos pigmentos, tratamientos de suelos, caucho y plásticos.
- Quitina (15-40 %): Productos químicos ricos en nitrógeno para productos farmacéuticos, cosméticos, textiles, tratamiento de agua, limpiadores domésticos, jabones y secuestro de dióxido de carbono.
- Proteínas (20-40 %): Fertilizantes y piensos.

Otras aproximaciones del contenido de quitina en los desechos de crustáceos son mostradas por Synowiecki y Al-Khateeb (2003), y son los siguientes:

Cuadro 1. Proporción de quitina en crustáceos en la masa corporal fresca total de algunos órdenes.

Orden	Agua dulce (%)	Agua salada (%)
Cladocera	4.9	12.2
Anostraca	2.2	1.5
Copepoda	12.4	5.8
Amphipoda	-	7.3
Decapoda	-	8.8

Elaborado con información de Cauchie (1997) citado por Synowiecki y Al-Khateeb, (2003).

Cuadro 2. Composición aproximada en porcentaje de base seca de desechos de conchas de crustáceos.

Fuente de quitina	Proteína	Quitina	Ceniza	Lípido
Cangrejo:				
• Collinectes	25.1	13.5	58.6	2.1
sapidus	29.2	26.6	40.6	1.3
• Chionoecetes opilio				
Camarón:				
• Pandalus borealis	41.9	17	34.2	5.2
• Crangon crangon	40.6	17.8	27.5	9.9
• Penaeus monodon	47.4	40.4	23	1.3
Cangrejo de río				
• Procamborus	29.8	13.2	46.6	5.6
clarkii				
Krill				
• Euphausia	41	24	23	11.6
superba				

Elaborado con información de Muzzarelli (1997), Naczk et al. (1981), Shahidi y Synowiecki (1991), Synowiecki y Al-Khateeb (2000), citados por Synowiecki y Al-Khateeb, (2003).

Extraer los compuestos de alto valor que quedan en los subproductos del procesamiento, así como reducir la carga ambiental y los costos de eliminación, podría aumentar el valor de la industria del camarón (Ahmadkelayeh et al., 2022) por lo que encontrar un método sostenible para su síntesis podría contribuir significativamente en la generación de ingresos para la bioeconomía (Yan y Chen, 2015).

2.4 Quitina

La quitina es un polímero lineal insoluble en agua (Jabeen et al., 2023) y ocupa el segundo lugar en términos de abundancia de polímeros, tanto en el reino animal como en el vegetal (Yurell et al. 2009), su fórmula química es $(C_8H_{13}O_5N)_n$ (Figura 1) y se denominada poli(β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina) (Ahmad Dar y Abd Al Galil,

2023) se puede extraer de las paredes celulares de algas y hongos, de los exoesqueletos de los insectos y de invertebrados marinos (Jabeen et al., 2023). Debido a que las conchas de varios tipos de crustáceos (camarones, langostas, cangrejos y krill) se encuentran fácilmente como desechos de las plantas que procesan estas especies, la producción industrial de este biomaterial se basa principalmente en el tratamiento de estas conchas (Lárez, 2006).

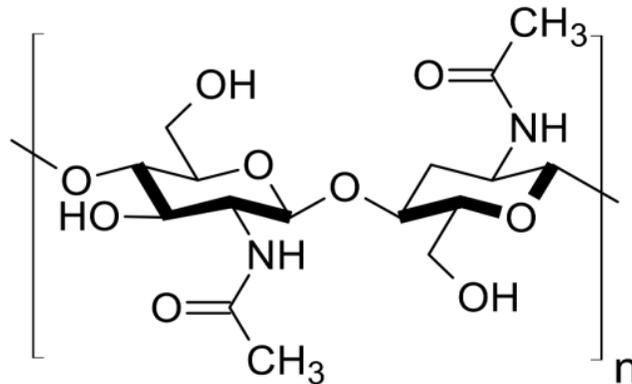


Figura 1. Estructura química de la quitina. Obtenido de Yadav et al. (2023).

Los pasos para la obtención de quitina a partir de crustáceos son: mediante hidrólisis enzimática o química (NaOH), se eliminan las proteínas, seguido de una desmineralización con tratamiento ácido y la eliminación de pigmentos y lípidos mediante blanqueamientos comunes (Thomas et al., 2019).

2.5 Quitosano

Es un polímero natural derivado del proceso de desacetilación de la quitina (Velasco et al., 2019), se encuentra en abundancia en exoesqueleto de crustáceos, insectos, artrópodos, así como en la pared celular de los hongos (Ahsan et al., 2018) aunque la versión comercial de este polímero natural proviene principalmente de quitina marina obtenida de desechos de camarón, cangrejos y langostas (Abd El-Hack et al., 2020).

La estructura química el quitosano (Figura 2) está formado por una cadena lineal que consiste en N-acetil-2-amino-2-desoxi-d-glucopiranososa (unidad acetilada) y 2-

amino 2-desoxidado-glucopiranososa (unidad desacetilada), unidos por enlaces β -(1-4)-glucosídicos (Ahmed y Ikram, 2017).

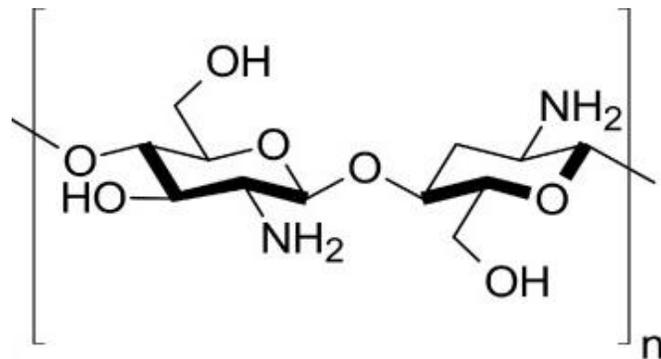


Figura 2. Estructura química del quitosano. Obtenido de Yadav et al. (2023).

Por tener un valor de constante de disociación ácida (pKa) aproximado de 6.4 por lo que se puede considerar como una base débil; respecto al peso molecular o la densidad de la cadena polimérica el quitosano se puede dividir en dos tipos, el quitosano de baja densidad o de alta densidad (Ahmed y Ikram, 2017), además es capaz de formar sales solubles en agua tales como el ácido acético y el ácido glutámico además la biocompatibilidad, biodegradabilidad, la baja toxicidad (Hashimoto et al., 2006), la actividad antimicrobiana y antitumoral y efectos de mejora inmunológica del quitosano ha conducido a un gran interés de diferentes campos como la medicina, la industria alimenticia, cosmética, el tratamiento de agua, la ingeniería biomédica y en la agricultura (Mukhtar Ahmed et al., 2020).

Para lograr la desacetilación de la quitina con un método químico Rudall (1966), citado por Ahmed y Ikram (2017), indican que la quitina “requiere ser lavada y purificada con NaOH al 25 % y al 50 % en proporción 1:5 (p/v) a 80 y 100 °C durante cinco y diez horas respectivamente”, una vez lograda la desacetilación será necesario hacer un lavado con agua desionizada hasta que alcanza un pH neutro para después emplear un horno de vacío a 60 °C para producir un producto de quitosano de peso seco (Figura 3).

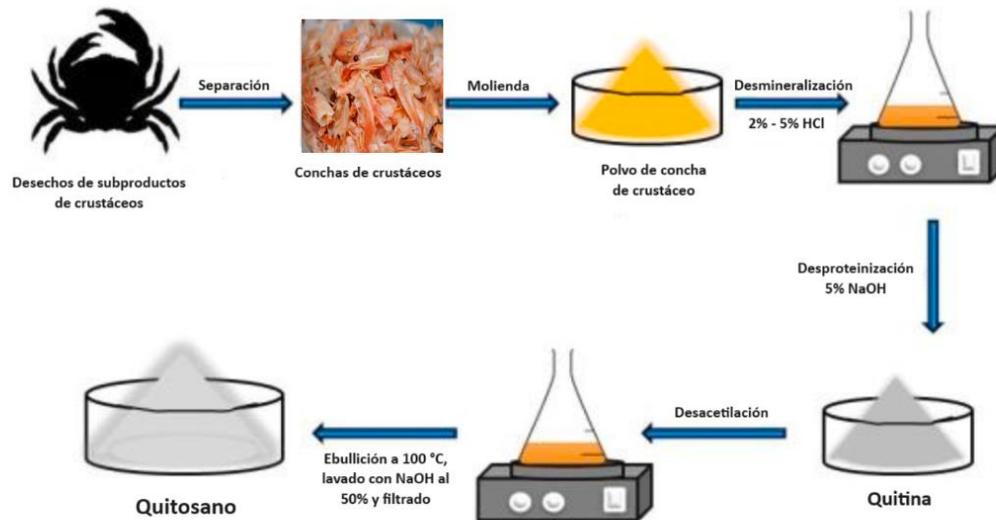


Figura 3. Desacetilación química de quitina. Modificada a partir de Yadav et al. 2023.

En cuanto a un método enzimático las quitinas decoloradas y purificadas obtenidas después de la desmineralización y la desproteización pueden reaccionar con NaOH para obtener quitosano. Durante cuatro horas, la concentración de NaOH puede oscilar entre 12.5 M y 140 °C. El quitosano producido de esta manera se disuelve completamente en agua en condiciones ácidas. Los desechos se lavan con agua destilada y, después de 12 horas de secado a 50 °C, se obtiene quitosano en peso seco (Ahmed y Ikram, 2017).

Propiedades

El quitosano elaborado a partir de quitina puede tener cualidades variables según la temperatura, la concentración, la duración y la desacetilación, lo que puede cambiar las características físicas, químicas o biológicas del producto.

Propiedades físicas

- **Desacetilación**

El quitosano es teóricamente un polímero de quitina sin grupos N-acetilos, y dependiendo del método y las condiciones en las que se obtuvieron a partir de la quitina, los polímeros de quitosano que se obtienen se utilizarán con diferentes propósitos (Falcón et al., 2013); es decir, el término "quitosano" se refiere a un grupo

de copolímeros que son heterogéneos en cuanto al grado de desacetilación, la masa molecular, el grado de polimerización y la constante de disociación ácida (valor pKa) (Malerba y Cerana, 2016).

Usualmente se establece que el grado de desacetilación del quitosano está entre 60-98% (Hernández, 2004), sin embargo, Riseh et al. (2022), señala que el quitosano con un grado de desacetilación mayor al 70% tiene mejores propiedades biológicas.

Se puede decir con seguridad que el grado de desacetilación del quitosano tiene un impacto significativo en las propiedades químicas y físicas (Hernández, 2004) así como en la actividad biológica pues de acuerdo con (Falcón et al., 2013) la distribución de las cargas positivas en la molécula impactará en la capacidad del polímero para solubilizarse en ácidos débiles o soluciones acuosas aciduladas.

- **Peso molecular**

Las propiedades fisicoquímicas del biopolímero están fuertemente influenciadas por el peso molecular del quitosano y para calcularlo generalmente puede obtenerse con el promedio de todas las moléculas presentes en la muestra y evaluarse utilizando técnicas sofisticadas (dispersión de luz, la osmometría, la RMN, la viscosimetría, la cromatografía de permeación en gel y la cromatografía de exclusión por tamaño) sin embargo todas estas pruebas tienden a arrojar resultados variados lo que provoca que las comparaciones entre diferentes muestras de fabricantes se tornen tediosas y complicadas (Ahmed y Ikram, 2017).

El peso molecular también es importante pues confiere diferentes propiedades fisicoquímicas como “viscosidad, hidrofilia, contenido de humedad, propiedades térmicas y estabilidad”; cuando las cadenas del polímero quitosano son de mayor longitud tiene un mayor grado de hidrólisis si se compara con las más cortas así también el quitosano de bajo peso molecular es capaz de penetrar en las células bacterianas ya que inhibe la transcripción de ARN lo que produce la muerte celular (Ahmed y Ikram, 2017).

Otros aspectos por considerar es que el peso molecular del quitosano disminuye con el grado de desacetilación (Ahmed y Ikram, 2017) y que se cree que a mayor peso molecular el quitosano es más estable; en cuanto a la uniformidad y funcionalidad del polímero se considera aceptable si la polidispersibilidad (relación del peso molecular y peso molecular medio) se encuentra entre 0.85 y 1.15; otros parámetros que afectan el peso molecular del quitosano son la estabilidad térmica del quitosano, la temperatura, el pH y el cizallamiento mecánico (Szymańska y Winnicka, 2015)

- **Viscosidad**

Varios factores, incluida la temperatura, el pH, la concentración, el peso molecular, el grado de desacetilación y el método de extracción, tienen un impacto en la viscosidad de la solución de quitosano, por ejemplo, a medida que aumenta la temperatura la viscosidad de la solución de quitosano disminuirá, el efecto contrario pasa a medida que aumenta la concentración (Ahmed y Ikram, 2017).

El quitosano funciona como un excelente potenciador de la viscosidad en medios ácidos. El criterio del pH de la solución determina el tipo de ácido utilizado para disolver el quitosano, lo que a su vez afecta la viscosidad de la solución; la importancia de la viscosidad intrínseca radica en su estabilidad y almacenamiento además se relaciona directa y proporcionalmente con el peso molecular promedio del polímero lo que permite que la solución pueda tornarse viscosa con los solventes. La viscosidad intrínseca se calcula con la ecuación de Mark Houwink:

$$[n] = k \times M_w^\alpha$$

Donde, n es la viscosidad intrínseca de la solución de quitosano, k y α son las constantes de conformación del polímero, y M_w es el peso molecular promedio de la viscosidad. La estructura esférica compacta del quitosano se define por $\alpha=0$, la espiral aleatoria por $\alpha=0.5-0.8$ y la espiral rígida por $\alpha=1.8$ (Ahmed y Ikram, 2017).

- **Higroscopicidad**

Se considera que el quitosano es un polímero higroscópico gracias a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales que se encuentran en la cadena polimérica, como -NH₂ con los átomos de O y -OH con los átomos H de la molécula de agua en este sentido la cantidad de humedad inherente de la muestra y la forma en que se almacena se relacionan con su capacidad de absorber agua (Ahmed y Ikram, 2017).

De acuerdo con Ahmed y Ikram, (2017) algunas de propiedades que sufren impacto por el contenido de agua son la compresibilidad, la viscosidad y las propiedades de flujo, así como la resistencia. Para calcular el contenido de agua contenida en una muestra de quitosano basta calcular la pérdida de peso después de someter a secado.

- **Propiedades térmicas**

Con el aumento de las temperaturas las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, viscosidad y cambios estructurales se pueden ver afectadas. El calentamiento excesivo produce degradación y pérdida de estabilidad en las soluciones poliméricas; esta degradación se presenta en tres pasos y puede medirse con un análisis termogravimétrico de solución y los cambios ocurren bajo los siguientes parámetros; para eliminar la humedad de la solución polimérica se requiere una temperatura de 30 a 110 °C, para producir una descomposición se requiere una temperatura entre 180–340 °C mientras que para que el quitosano pierda peso se requiere someter a la solución polimérica a una temperatura de 470 °C, finalmente se ha demostrado que la temperatura de transición vítrea no afecta las propiedades fisicoquímicas del quitosano (Szymańska y Winnicka, 2015)

Propiedades químicas

- **Solubilidad**

El quitosano es insoluble en agua y con bases acuosas en cambio algunos ácidos orgánicos e inorgánicos con un pH inferior a 6.0 si suelen ser solubles en quitosano.

Los ácidos orgánicos que normalmente muestran solubilidad con el quitosano son el ácido metanoico (HCOOH), el ácido acético (CH₃COOH), el ácido clorhídrico (1% HCl), el ácido nítrico diluido (HNO₃) y el ácido láctico entre otros sin embargo es el ácido metanoico el que se considera el mejor disolvente para el quitosano de todos ellos (Ahmed y Ikram, 2017).

Otra característica importante es que el quitosano es capaz de formar sales solubles en agua como piruvato, malato, lactato, malonato, ascorbato, acetato, tartarato, glioxilato y glicolato; sin embargo, la neutralización de los ácidos HCl, HCOOH, CH₃COOH y C₃H₆O₃ produce sales insolubles (Ahmed y Ikram, 2017).

Además, el quitosano es sustancialmente soluble en poliol acidificado, pero no es soluble en disolventes orgánicos no polares como la dimetilformamida y el dimetilsulfóxido al igual que otras propiedades fisicoquímicas la solubilidad del quitosano en solución está estrechamente relacionada con el grado de desacetilación, el método de extracción, el tiempo, la temperatura, las concentraciones y el peso molecular del mismo (Ahmed y Ikram, 2017).

- **pH de la solución de quitosano**

El quitosano es una base fuerte como resultado de la presencia de -NH₂ libres a lo largo de la cadena las cuales tiene un valor pK_a de 6.3, la importancia del pH en la solución es su capacidad de alterar las propiedades y la carga del quitosano, cuando se mantienen pH bajos los grupos -NH₂ que se encuentran libres protonan y adquieren una carga positiva en lugar de una carga negativa lo cual resultará en que el quitosano se convierta en polielectrolito catiónico y, por tanto, soluble en agua, lo contrario a este escenario es cuando el pH es alto (>6.0) en cuyo caso los grupos amino se desprotonan provocando que el quitosano sea insoluble finalmente es importante tomar en cuenta que el grado de desacetilación y del método de extracción condicionarán el valor pK_a del quitosano (Ahmed y Ikram, 2017).

- **Reactividad**

De acuerdo a lo mencionado con Ahmed y Ikram (2017) la cadena lineal del quitosano contiene en sitios reactivos en los grupos funcionales -NH₂ y -OH así que

el quitosano será más reactivo cuanto más protonados estén estos grupos funcionales, especialmente el grupo amino, dicha reactividad del grupo -NH₂ aumenta con el número de protones que recibe, lo que aumenta su capacidad para unirse a iones metálicos tóxicos y formar quelatos con iones metálicos de transición, esta cualidad confiere la importancia y utilidad del quitosano en el tratamiento de agua y purificación del aire.

Además, a temperatura ambiente, el quitosano puede reaccionar con aldehídos y cetonas para producir aldaminas y cetaminas, respectivamente, también, se pueden obtener grupos amino proteicos y no proteicos que contengan glucanos reaccionando el quitosano con cetoácidos y luego reaccionando con borohidruro sódico. La reactividad, solubilidad, adsorción y biodegradabilidad del quitosano se ven significativamente afectadas por su naturaleza catiónica, que tiene una alta densidad de carga positiva (Ahmed y Ikram, 2017).

Propiedades biológicas

- Actividad antifúngica

El quitosano es un biopolímero antifúngico que resulta ser efectivo contra una amplia gama de patógenos, pues logra la inhibición total o parcial de los patógenos según la especie fúngica, el grado de polimerización y N-acetilación del propio quitosano (Hernández, 2004); debido a sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad, el quitosano es una molécula ideal para ser utilizada en una variedad de enfoques sostenibles que respeten el medio ambiente (Kumaraswamy et al., 2018).

2.6 Nanopartículas de plata

Una nanopartícula de plata es cualquier partícula cuyo constituyente mayoritario tenga plata y tenga una dimensión que va de 1 a 100 nm, gracias a la nanotecnología este tipo de partículas se ha incorporado como agentes microbianos en cientos de productos además, las NPsAg presentan características fisicoquímicas únicas ventajosas a diferencia de su constituyente metálico Ag, este incremento en sus propiedades se debe probablemente al aumento entre la relación

del área de la superficie y el volumen conferido gracias al nivel nanométrico (Aliano y Cicero, 2016).

En aplicaciones biológicas algunos de los efectos positivos de las NPsAg se relacionan el incremento del rendimiento de los cultivos, inducir la germinación, inhibirla síntesis de etileno, acumular nutrientes, sintetizar pigmentos y promover el desarrollo de cultivos *in vitro* (Castro et al., 2019), mejorar la eficiencia de las plantas para absorber y translocar más nutrientes (Yadu et al., 2021), sin embargo, su capacidad microbicida es destacable y puede explicarse por tres mecanismos, la primera es impedir la absorción de nutrientes esenciales de la célula gracias a una unión excesiva de los iones de las NPsAg que eventualmente desencadenaría la muerte de la célula, la segunda es mediante la competencia de uniones entre los iones de Ag con metales fundamentales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} y la tercera es con la formación de complejos con ligandos o sustratos que se acumulan de forma irreversible de Ag dentro de la célula y que una vez ahí son capaces de inhibir la respiración y condensar o unirse al ADN (del Rocío et al., 2017).

En el cultivo de tejidos vegetales, la aplicación de nanopartículas ha demostrado ser beneficiosa para la inducción de callos, organogénesis, embriogénesis somática, variación somaclonal, transformación genética y producción de metabolitos secundarios (Figura 4) (Chávez et al., 2020), de igual forma funcionan bien para desinfectar los medios de cultivo y los explantes (Tung et al., 2022) sin embargo, la efectividad de las nanopartículas depende de su estructura química, tamaño, área de superficie cubierta, capacidad reactiva y, de manera crucial, la dosis necesaria para lograr su eficacia (Khodakovskaya et al., 2012)

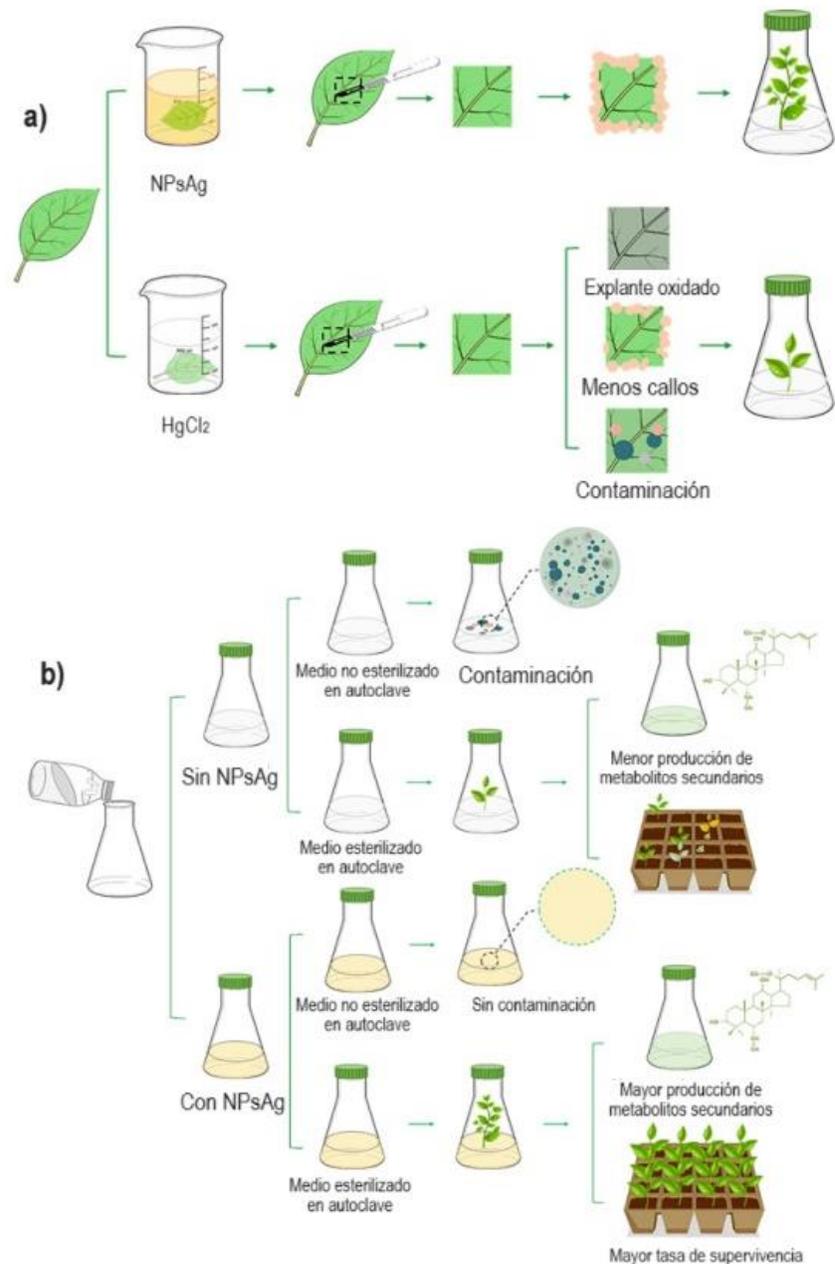


Figura 4. a) Nanopartículas de plata (NPsAg) aplicadas como desinfectante de explantes, b) Nanopartículas de plata (NPsAg) aplicada al medio de cultivo. Modificada de a partir de Tung et al. 2021.

Las desventajas de su implementación incluyen la necesidad de evaluar la concentración de NPsAg para cada modelo de estudio, así como la citotoxicidad en y su potencial impacto para el medio ambiente (Bello y Spinoso, 2022).

2.7 Contaminación microbiana en la micropropagación

Se considera que la contaminación microbiana en la micropropagación de especies vegetales genera enormes pérdidas tanto para los trabajos de investigación como a nivel comercial siendo así una de las problemáticas dentro de esta área, sin embargo, los hongos, los virus, fitoplasmas y algunos artrópodos son otros organismos que se asocian a la contaminación de cultivos *in vitro* (Hernández y González, 2010).

Para lograr reducir la contaminación se requiere aplicar la técnica estéril que consiste en emplear una serie de medidas con la finalidad de disminuir la presencia de factores contaminantes durante el proceso; esta técnica incluye uso de agentes químicos, así como calibrar y manejar equipos empleados en el proceso de cultivo de tejidos vegetales (Suárez, 2020), del mismo modo Tung et al. (2021), indica que los pasos necesarios a seguir para reducir la contaminación son esterilización de instrumentos y equipos, aplicación de sustancias químicas para desinfectar las superficies de los explantes, la gestión apropiada de los medios de cultivo y los explantes a lo largo del proceso de cultivo, y asegurar condiciones adecuadas para el equipo.

2.8 Familia Bromeliaceae

En el territorio nacional la familia Bromeliaceae se conforma con 19 géneros, 422 especies y 8 taxones infraespecíficos que en total incluyen 430 taxas, los géneros que poseen un mayor número de especies son *Tillandsia* con 230 spp lo cual representa el 54.5 % de las especies totales de esta familia botánica en México (Figura 4). Sobre el endemismo 318 especies de las 422 especies totales reportadas son endémicas de México; los estados de la república con endemismo estricto son Oaxaca 56 taxones endémicos, Chiapas con 24, Guerrero con 21 (Espejo y López, 2018) (Figura 5).

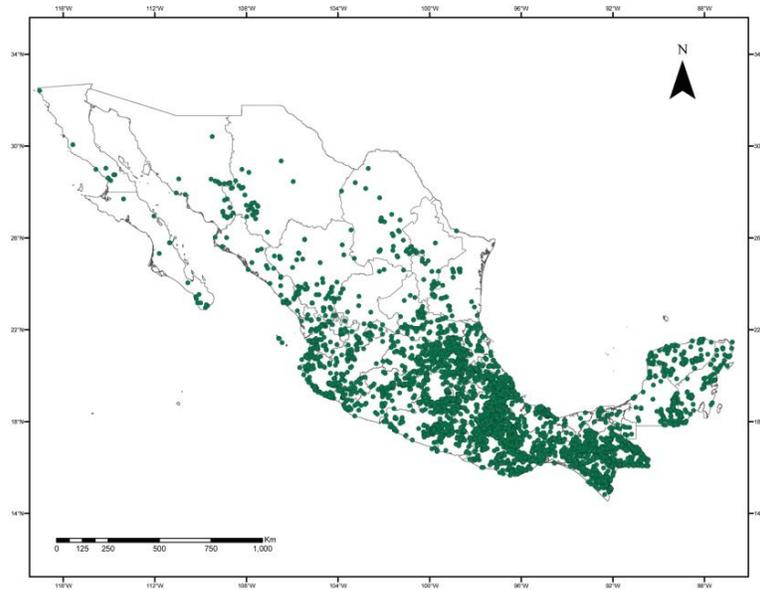


Figura 5. Registro nacional de bromeliáceas. Obtenido de Espejo y López, (2018).

2.9 *Tillandsia ionantha* Planch.

Debido a que *T. ionantha* Planch. es capaz de subsistir enteramente con humedad atmosférica que entrar en contacto con ella se considera que es una planta altamente especializada por lo que debe considerarse como una planta epífita atmosférica (Benzing y Dahle, 1971), además existe un gran interés por ella en la horticultura habiendo ejemplares en colecciones privadas y en jardines botánicos alrededor del mundo (Ancona *et al.*, 2021).

Los hábitats más frecuentes para *T. ionantha* Planch. incluye en bosques bajos caducifolios, bosques de encino, matorrales xerófilos y sabanas estacionales pudiendo colonizar ramas de árboles e incluso paredes rocosas en cañones de ríos y se encuentra distribuida en México y Centroamérica (Ancona *et al.*, 2021), sin embargo, las plantas muestran variaciones morfológicas en las rosetas y hojas por lo que según Sosa (2012), se reconocen seis taxones; *T. ionantha* var. *ionantha*, *T. ionantha* var. *maxima* Ehlers, *T. ionantha* var. *scaposa* LBSm., *T. ionantha* var. *estricta* Koide f. *estricta*, *T. ionantha* var. *estricta* f. *fastigiata* Koide, *T. ionantha* var. *vanhyningii* M.B.Foster y *T. ionantha* var. *zebrina* B.T. Foster (Figura 6).

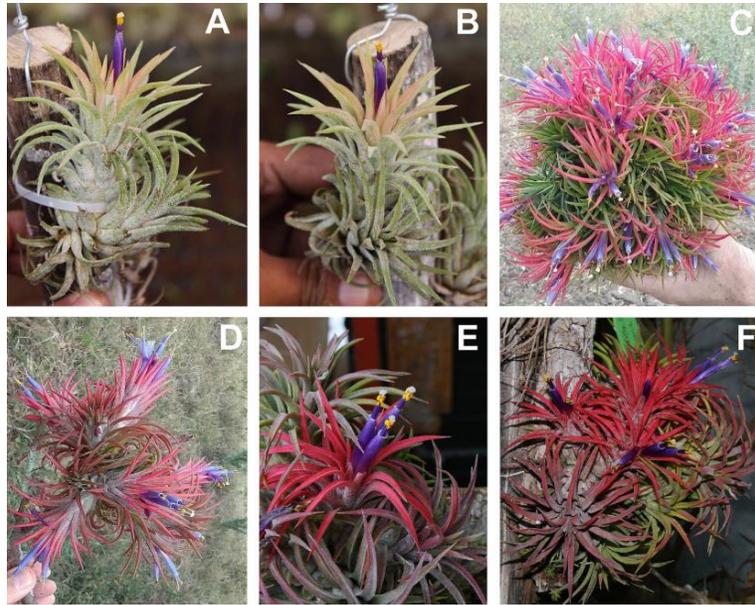


Figura 6. Ejemplares vivos de *Tillandsia ionantha* Planch. var. *ionantha* (A y B) *Tillandsia ionantha* Planch. var. *ionantha*, Jalcomulco, Veracruz; (C) El Higo, Veracruz; (D) Santa Fe, Tamaulipas; (E y F) Acazónica, Veracruz. Obtenido de Ancora (2021).

Sobre su descripción botánica, las hojas tienen una longitud aproximada de entre 4 -8.5 cm y forman una roseta densa y erecta con escamas evidentes, la inflorescencia es cota y compuesta de entre una y tres flores, las brácteas primarias son mucho más largas pues miden cerca de 4 cm, las brácteas florales son las largas que los sépalos en la antesis y envolviéndolos, erectas, ecarinadas, inconspicuas y finamente nervadas, glabras, membranáceas, las cápsulas miden entre 2.5 - 4.5 cm de largo (Véliz, 2010), las semillas miden menos de 5 mm, están rodeadas por una cubierta semiplumosa, se conforman de endospermo, un cotiledón vestigios de hojas primarias y secundarias, ápice de brote e hipocótilo, solo una tercera parte del volumen total de la semilla corresponde al embrión y se ubica en la parte opuesta a la inserción del ovario, externamente tiene un apéndice plumoso (Sosa, 2012), el sistema radical se compone por varias raíces que se ramifican de tipo adventicias con nervaduras y se consideran más como un órgano de sostén que de absorción, además las raíces no tienen pelos adsorbentes pero si tienen una cofia bien desarrollada (Benzing y Dahle, 1971).

2.10 Cultivo *in vitro*

La definición general de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales incluye el cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos y plantas. El crecimiento en condiciones estériles, en un medio nutritivo, generalmente gelificado, y en condiciones ambientales controladas (temperatura y luz) son comunes entre estos diferentes tipos de cultivo (Castillo, 2004), es decir consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (Rosales et al., 2008), además Perea (2009), indican que este proceso involucra las siguientes etapas: la selección de la especie, el establecimiento del medio de cultivo, el desarrollo del tejido, enraizamiento y acondicionamiento o aclimatación (Figura 7).

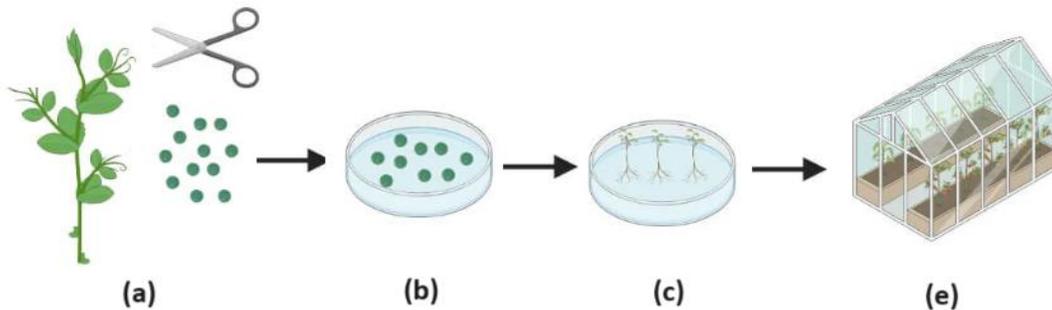


Figura 7. Etapas del cultivo *in vitro* a) Selección de la especie; b) establecimiento del medio de cultivo, c) desarrollo del tejido; e) enraizamiento y acondicionamiento o aclimatación. Modificada a partir de Kapali, (2023).

Actualmente se emplean materiales como el polipropileno, sin embargo, el término cultivo *in vitro* tiene su origen en que comúnmente esta técnica se realizaba en recipientes de vidrio. La micropropagación es el término más utilizado para describir el método de cultivo de tejidos utilizado para propagar vegetativamente una planta (Castillo, 2004).

2.11 Totipotencia

La totipotencia vegetal se define como “la potencialidad de las células diferenciadas y especializadas para formar plantas completas”, el fisiólogo Göttlieb Haberlandt en 1902 indicó que las células vegetales terminalmente diferenciadas deben poder

regenerar plantas enteras siempre que tengan completo el número cromosomas (Figura 8). Esta capacidad de las células vegetales es propia de los organismos multicelulares que proceden de un cigoto inicialmente unicelular pero que después de múltiples divisiones y diferenciaciones mitóticas (Bhojwani y Dantu, 2013).

Esta capacidad de las células vegetales les otorga a las plantas la capacidad de sobrevivir en la naturaleza dotándolas para reproducirse por múltiples vías vegetativas, así como para restaurar rápidamente brotes y raíces dañadas (Ezhova, 2003).

Además, la totipotencia permitió el desarrollo de aplicaciones prácticas en el campo de la biotecnología por ejemplo los cultivos de células no especializadas y los cultivos de raíces se pueden emplear para la producción comercial de metabolitos secundarios valiosos, la habilidad para formar brotes se utiliza en la tecnología de micropropagación de genotipos valiosos, como híbridos exclusivos, material desinfectado o especies de plantas raras por su parte la capacidad de embriogénesis somática también puede emplearse con el mismo propósito; los embriones somáticos encapsulados en cápsulas gelatinosas, sirven como "semillas artificiales" que incluso pueden ser plantadas en semilleros (Ezhova, 2003).

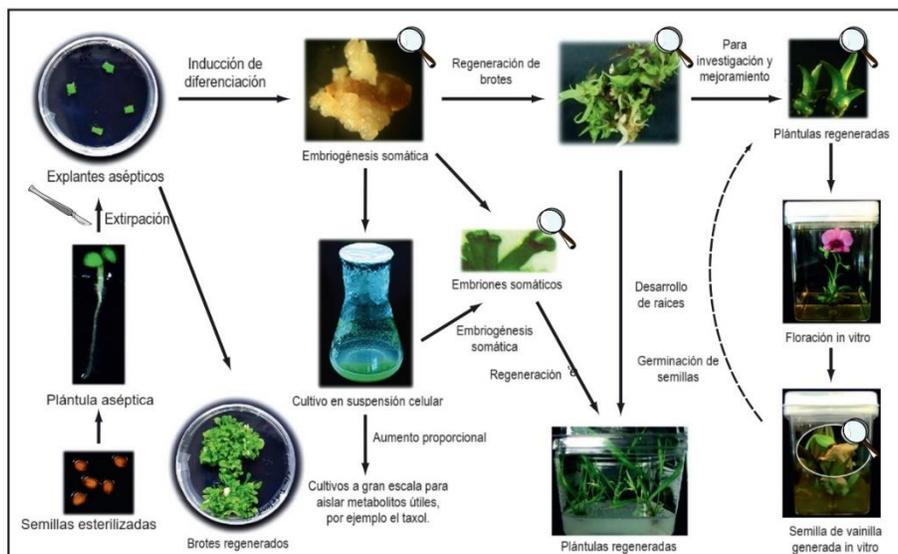


Figura 8. Tipos de cultivos de tejidos generados a partir de la capacidad de las células vegetales de generar nuevas plantas. Modificada a partir de Bhojwani y Dantu, 2013.

2.12 Embriogénesis somática

En este proceso se induce la formación de células indiferenciadas (Figura 9) que se constituyen en forma en una masa amorfa llamada comúnmente callo, es sobre esta formación que se induce la formación de embriones que tienen la capacidad de crecer, el desarrollo del callo será posible en función de los reguladores de crecimiento y del medio de cultivo que se emplean; los embriones formados en el callo completarán su desarrollo creciendo, madurando y posteriormente germinado lo que genera una nueva planta (Seguí, 2011).

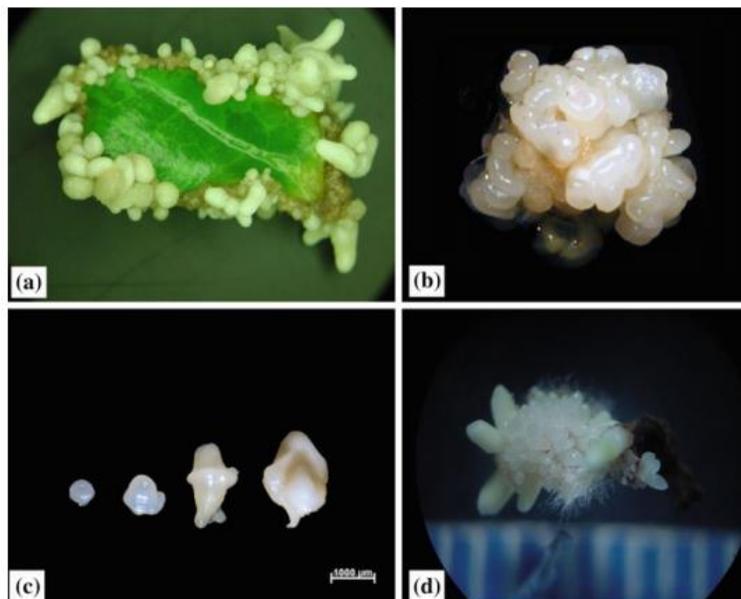


Figura 9. Embriogénesis somática, ejemplos de procesos de embriogénesis somática en diferentes especies. a) Embriogénesis somática en una hoja de *Coffea canephora*. b) Masa embriogénica de *Cocos nucifera*. c) Diferentes etapas de desarrollo del genoma AAB de *Musa acuminata* x *Musa balbisiana*, subgrupo Plátano. d) Masa embriogénica de *Agave tequilana*. (Obtenida de Loyola y Ochoa, 2016).

Se presentan dos tipos de embriogénesis somática, la directa y la indirecta en la primera se considera un tipo de embriogénesis rara y consiste en la formación directa a partir de una o de un grupo pequeño de células (estilos, o polen) sin que se produzca un callo en el proceso, a diferencia de la embriogénesis somática indirecta donde lo primero es que a partir de un explante se forme un callo para luego producir embriones a partir del callo (Bhatia y Bera, 2015).

Por su parte Freire (2003), indica que las etapas la regeneración mediante vía embriogénesis somática en un sistema experimental son: la inducción de los embriones somáticos, desarrollo de los embriones somáticos, proliferación, maduración, germinación y conversión. Se considera que la embriogénesis somática como una vía para la propagación y una herramienta del cultivo *in vitro* para el mejoramiento genético y para la conservación de germoplasma.

2.13 Organogénesis

La organogénesis se define de acuerdo con Desai et al. (2022), como la capacidad de generar órganos (brotes, raíces, flores, tubérculos) a partir de un explante. La organogénesis se conforma por tres fases sucesivas, la primera es la fase de desdiferenciación en donde el tejido desarrolla la capacidad de responder a la señal organogénica, la segunda fase es la inducción donde la citoquinina ejerce su acción sobre los brotes y las auxinas sobre las raíces, finalmente en la fase de diferenciación las células tienen un destino determinado dando así origen a brotes o raíces (Davey, 2017) (Figura 10).

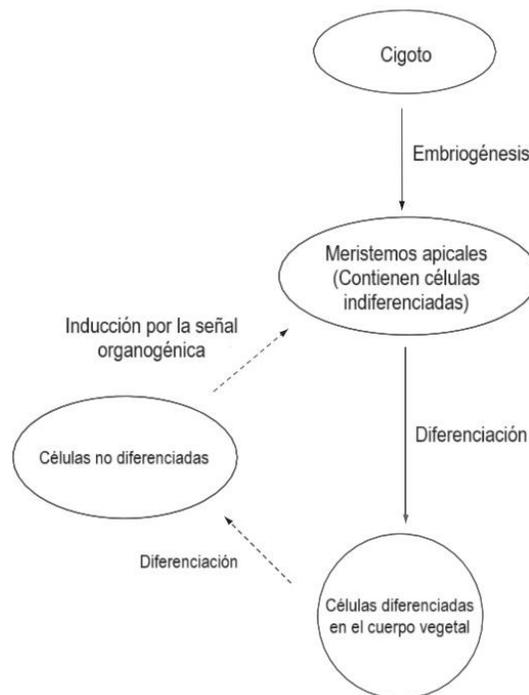


Figura 10. Fases del proceso de organogénesis. Modificada a partir de Davey, 2017.

Se puede diferenciar dos tipos de organogénesis, la directa y la indirecta; en la organogénesis directa los brotes y las yemas se forman a partir del tejido sin pasar por la etapa de callo, la ventaja de este tipo de organogénesis es la mejora en la tasa de multiplicación y producción de plantas de tipo transgénico, así como para la propagación clonal, por su parte, en la organogénesis indirecta se puede observar como a partir del de la formación previa de callos en el explante se generan brotes a partir de la diferenciación del tejido calloso (Bustamante et al., 2022).

2.14 Medio de cultivo

El medio de cultivo es un elemento de la técnica de cultivo *in vitro* que funciona simultáneamente como sustrato y fuente energética para el desarrollo de los tejidos (Suárez, 2020), además su composición puede variar dependiendo del genotipo de la planta y el objetivo de la investigación (Perea, 2009).

En términos generales los elementos indispensables en los medios de cultivo para lograr el crecimiento de los tejidos vegetales son los minerales necesarios en grandes cantidades llamados macroelementos (potasio, calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre) y en menos cantidades los microelementos (hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno), carbohidratos (sacarosa, D-Manitol, D-Sorbitol), vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, mioinositol, ácido ascórbico), reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno (Bhojwani y Dantu, 2013), además, de complejos naturales y agentes de soporte y gelificación (Cruz, 2012).

Respecto a la concentración de los reguladores de crecimiento dentro del medio de cultivo pueden establecerse empíricamente mediante la experimentación exploratoria y toda vez que se le logre identificar la óptima combinación de ellas podrán ser usadas para la especie e incluso para especies que se encuentren estrechamente relacionadas (Kumar y Loh, 2012).

Los ensayos empíricos generalmente se utilizan para elegir el medio nutritivo adecuado para una especie o tejido específico esto se puede lograr mediante el uso

de soluciones madre de diferentes grupos de componentes minerales para realizar y así realizar un análisis sistemático de diferentes concentraciones de los componentes del medio (Kumar y Loh, 2012).

2.15 Conservación ex situ

La práctica de conservación *ex situ* se enfoca en la formación de colecciones adecuadamente estructuradas en función de los hábitats de un área. Además, es esencial comprender cómo cultivar las plantas amenazadas y sus necesidades ecológicas para utilizarlas en la recuperación de las poblaciones naturales (Bacchetta et al., 2008).

La preservación de plantas fuera de su entorno natural se presenta como una táctica crucial, especialmente para aquellas especies vegetales que enfrentan sobreexplotación, riesgo de extinción, escasa disponibilidad y susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la replantación (Sharma et al., 2023), por lo que el propósito fundamental de la preservación fuera de su entorno natural es disminuir la amenaza de extinción de especies y en algunos casos reintroducir nuevas poblaciones en su hábitat original (Lascuráin et al., 2009).

La conservación *ex situ* también se considera importante para llevar a cabo investigaciones sobre diversos aspectos de la biología o comportamiento de las especies, además, contribuye al avance de la reproducción *in vitro* (Lascuráin et al., 2009) así mismo, se puede cultivar y producir grandes cantidades de material vegetal para plantación (Sharma et al., 2023).

De acuerdo con Walsh et al. (2024), las formas en que puede realizarse la conservación *ex situ* incluye tecnologías criobiológicas, bancos de semillas, almacenamiento y cultivo de tejidos, así como mediante el cultivo de colecciones de plantas vivas y maduras en instalaciones específicamente dedicadas a la conservación, ya sea en entornos controlados o en exhibiciones mixtas o colecciones de referencia, este tipo de colecciones proporcionan una red de seguridad para la especie hasta que sea posible contar con un hábitat protegido

adecuado, permitiendo a los conservacionistas avanzar con iniciativas de conservación y restauración en el entorno natural (*in situ*).

En ejemplo de conservación *ex situ* son los jardines botánicos ya que de acuerdo con la Asociación Mexicana de Jardines Botánicos, A.C. (AMJB) cumplen tres funciones principales: la investigación en áreas como etnobotánica, la sistemática, la educación ambiental, la ecología, la horticultura, la florística y la propagación tanto *in vitro* como mediante métodos tradicionales, la conservación que se vincula con la investigación y la educación y finalmente la exhibición de las plantas para la educación ambiental (Lascuráin et al., 2009).

2.16 Conservación *in vitro*

La pérdida de recursos naturales, ancestros silvestres y cultivares antiguos que poseen genes valiosos y necesarios en el desarrollo de programas de mejoramiento son algunas de las consecuencias de no implementar estrategias adecuadas para la conservación de germoplasma además, cuando los factores naturales o humanos ponen en riesgo la conservación *in vivo* o cuando el material vegetal con el que se cuenta es muy limitado el cultivo de tejidos se convierte en el método más seguro de conservación (Bhojwani y Dantu, 2013).

La aplicación típica de la tecnología *in vitro* en la conservación de plantas impulsa la preservación, reintroducción y recuperación de especies, especialmente cuando los bancos de semillas o los métodos de propagación convencionales resultan insuficientes o inadecuados, así mismo, la propagación de plantas mediante tecnología *in vitro* abarca diversas modificaciones y técnicas, como la micropropagación y la embriogénesis somática enfocándose así en la producción de especímenes o clones genéticamente idénticos, para regenerar organismos completos a partir de tejidos y células (Kulak et al., 2022).

Para este tipo de conservación de material vegetal *in vitro* Bhojwani y Dantu (2013), indican que existen dos opciones:

- El primero es el almacenamiento a mediano plazo, que implica mantener los cultivos en condiciones que limitan su crecimiento.
- El segundo es el almacenamiento a largo plazo, que implica la criopreservación del material vegetal a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C) con ayuda de nitrógeno líquido (-196 °C).

Mantener e intercambiar el germoplasma en un estado genéticamente estable y libre de enfermedades a través del cultivo de tejidos es en términos generales el objetivo principal de la tecnología de conservación *in vitro*, por lo que un programa de conservación de este tipo requiere instalaciones especiales de cultivo de tejidos, invernaderos, almacenamiento, computadoras e instalaciones de monitoreo de la estabilidad genética además de la asistencia de expertos y técnicos calificados (Rajasekharan y Sahijram, 2015).

2.17 Germinación

La germinación involucra todos aquellos procesos que comienzan con la absorción de agua por la semilla quiescente, y terminan con la elongación del eje embrionario. La señal visible de la finalización de la germinación es, en general, la emergencia de la radícula embrionaria a través de las cubiertas seminales (Varela y Arana, 2011), el crecimiento de las plántulas no es parte de la germinación, que ocurre después de la germinación completa (Bewley et al. 2013).

Respecto a la germinación en las especies de *Tillandsia*, se considera que una semilla ha germinado cuando se presenta una ruptura del tegumento interno a nivel del hipocótilo hinchado (Cecchifiordi et al., 2001, Sosa, 2012 y Elizalde, 2014), además, la germinación de *Tillandsia* es de tipo epígea, con un cotiledón que no se desprende de la cubierta seminal lo cual preserva su función asutoral, dando así origen a plántulas de tipo criptocotiledóneas.

La respuesta germinativa de las poblaciones puede variar en la capacidad germinativa, la distribución de esta en el tiempo, el tiempo en que tarda en germinar

la primera semilla, el tiempo medio que una muestra o población tarda en germinar, así como la simultaneidad de la germinación (Bewley y Black, 1978 citado por González y Orozco, 1996).

2.18 Prueba de tetrazolio

Para generar programas de conservación ex situ de semillas que permitan mitigar los efectos de la explotación ilegal, se requiere comprender las características propias de la germinación (Flores et al., 2015).

Para determinar si una muestra de semillas tiene la capacidad de germinar, se pueden realizar pruebas de viabilidad de semillas las cuales de acuerdo con Schmidt (2007), incluyen técnicas para evaluar visualmente las semillas y para medir al menos algunos procesos críticos, dentro de estas técnicas, se encuentra la prueba de tetrazolio, la cual se basa en la evaluación topográfica de una prueba bioquímica que indica cuando las estructuras embrionarias se encuentran vivas y que son las que permiten la germinación de la semilla (Dadlani y Yadava, 2023).

El principio sobre el cual se sustenta la prueba sostiene que las deshidrogenasas constituyen una categoría de enzimas metabólicas presentes en las células en estado de actividad metabólica, las cuales, liberan hidrógeno durante los procesos de reducción, por su parte, hidrógeno tiene la capacidad de transformar una solución de color amarillo pálido, a la cual se le ha aplicado cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio o bromuro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, en un trifenilformazán estable de color rojo brillante (Schmidt, 2007).

En consecuencia, la generación de formazán rojo sirve como un marcador de la actividad deshidrogenasa, lo que a su vez indica la actividad metabólica y, por ende, la viabilidad celular. Debido a que la coloración del tejido es localizada, es factible distinguir entre las secciones vivas (de tono rojo) y las muertas (sin color) de la semilla. En situaciones donde el tejido muerto (necrótico) se presenta solo en la superficie de los cotiledones, mientras que la radícula se tiñe de manera habitual, las semillas todavía podrían conservar su viabilidad. En cambio, incluso pequeñas

áreas de tejido necrótico en la región esencial del embrión generalmente indican que la semilla no sería capaz de germinar (Schmidt, 2007).

Algunas de las ventajas de esta prueba es que puede considerarse como una alternativa a las pruebas de germinación estándar, además ayuda a evaluar el estado tanto físico como fisiológico de las semillas colaborando en la detección de alteraciones estructurales y daños causados por insectos y por la manipulación postcosecha, además, la ejecución de esta prueba es simple, no requiere equipo costoso y los factores ambientales no afectan la prueba (Dadlani y Yadava 2023).

Sin embargo, para obtener resultados más precisos en las pruebas de tetrazolio de semilla de una especie específica (da Silva et al., 2012) indican que puede ser necesario realizar variaciones en las condiciones de las pruebas por lo que, para garantizar el éxito de una prueba se deben considerar factores como la concentración, tiempo de tinción, temperatura, así como la correcta interpretación del patrón de tinción (Abbade y Takaki, 2014).

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Antecedentes

Entre los años 1930 y 1950 la quitina y el quitosano pasaron por un proceso de exploración desarrollándose algunas aplicaciones y nuevos métodos para su síntesis química publicándose en libros importantes sobre la materia por lo que, se considera que a partir de 1970 y hasta 1980 la investigación sobre estos biopolímeros y sus derivados alcanzó la madurez posibilitando más de 2000 aplicaciones (Crini, 2019).

Dentro de las variadas aplicaciones del quitosano se encuentran las relacionadas con la agricultura, autores como Pichyangkura y Chadchawan (2015), reportan la capacidad del quitosano como estimulante en varios tipos de respuesta en plantas de interés hortícola como la papaya, el durazno, la pera, cítricos, coco, manzana, cerezas, etc., ya que se ha demostrado la efectividad del quitosano en procesos fisiológicos como resistencia al estrés abiótico, la mejora del crecimiento y del rendimiento, la vida útil de flores y frutos, y la activación de la producción de metabolitos secundarios.

Los beneficios del quitosano sobre el control fitopatológico se reporta en trabajos como el de Li et al. (2013), donde determinaron que el remojo de semillas de sandía con quitosano derivado de exoesqueleto de cangrejo (>85 % doble desacetilado) disminuyó la muerte de las plántulas causado por la bacteria *Acidovorax citrulli* y aumentó el peso fresco y seco de las plántulas del mismo modo, Pabón et al. (2015), reportan la capacidad del quitosano para inhibir el crecimiento del micelio, la esporulación y germinación de esporas de los hongos *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata* en *Jatropha curcas* L.

Otro ejemplo es la investigación de Xu, et al. (2007), donde señalan que el crecimiento micelial de nueve fitopatógenos *F. graminearum*, *F. Oxysporum*, *Verticillium dahlia*, *Phytophthora capsici*, *Pyricularia oryzae*, *A. solani*, *B. cinerea*, *C. orbiculare* y *Exserohilum turcicum* se vieron afectados por oligoquitosano, así

también Bautista et al. (2003), reportaron que el quitosano es capaz de limitar el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en el cultivo de *Carica papaya* L. cuando se aplica mediante inmersiones de quitosano a concentraciones de 15 g L⁻¹ y 5 g L⁻¹.

También se han generado pruebas *in vitro* como la de López et al. (2013), en la que se demostró que la presencia del quitosano al 1 % generaba una inhibición significativa del crecimiento micelial, germinación y esporulación de *Alternaria alternata* así como una intensa vacuolización del micelio y esporas, la salida de material citoplásmico y la formación de material fibrilar alrededor de las células; un efecto semejante a las estructuras de *Alternaria alternata* producido por quitosano es el reportado por Meng et al. (2020), quienes determinaron que el quitosano era capaz de inhibir significativamente la germinación de esporas, el crecimiento del micelio, inducir cambios notables en la morfología externa y la microestructura interna de *Aspergillus ochraceus* degradando la pared celular, perturbando la integridad de la membrana celular así como la inhibición de la biogénesis de los ribosomas.

En cuanto a pruebas postcosecha Liu et al. (2007), encontró que el quitosano controló con eficiencia *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en *Solanum lycopersicum* L. almacenados a 25 y 2 °C respectivamente, pues la germinación de esporas, la elongación del tubo germinativo, el crecimiento del micelio de ambos hongos mostraron una fuerte inhibición por el quitosano así mismo, se desencadenó una respuesta bioquímica en el tomate pues mejoró la actividad de la polifenoloxidasas, la peroxidasa y el contenido de compuestos fenólicos.

Por otra parte, los beneficios que el quitosano provee a la germinación de las semillas se demuestran en investigaciones como la generada por Rahman et al. (2013), donde el quitosano confiere una mejora en la tolerancia salina en semillas de *Lens culinaris* L., el aumento significativo del porcentaje de germinación, el incremento de la longitud y el peso seco del hipocótilo y de la raíz.

En la investigación generada por Costales et al. 2020, con *Glycine max* L. afirman que la imbibición de semillas con soluciones de quitosano con diferentes concentraciones y masas moleculares tuvieron efecto en el porcentaje de germinación, el crecimiento de las plántulas, incremento en el número de hojas, aumento en la longitud del tallo y raíces, así como la masa seca radical y el área foliar de las plántulas.

Finalmente, el uso de quitosano polimérico y oligomérico en especies ornamentales como *Dendrobium* 'Eiskul'. reporta tener efectos beneficios en las diferentes etapas de su micropropagación en términos de la regeneración de plántulas con fines de obtener la mejor cantidad y calidad de plantas (Pornpienpakdee et al., 2010).

Respecto a las NPsAg son el nanomaterial más utilizado, representando casi el 25 % de todos los productos empleados por la nanotecnología (Tymoszuk, 2021), en parte gracias a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas (Pokhrel et al., 2012) por lo cual se han generado investigaciones biológicas para determinar sus posibles aplicaciones en la agricultura y en la biotecnología por ejemplo, se han desarrollado trabajos sobre la aplicación de NPsAg en cultivo *in vitro* con fines de sanidad como el trabajo Tung et al. (2021), en que se aplicaron NPsAg al medio de cultivo como desinfectante en el cultivo crisantemo resultando igualmente útil como promotor de generación de callos, en el incremento de tamaño de los explantes y mejor calidad de los brotes, en cambio cuando se aplicaron al medio de cultivo en *Fragaria x ananassa* se obtuvo una mejora significativa en desinfección de explantes y multiplicación de brotes así como en la reducción de la acumulación de etileno (Tung et al., 2021).

También se reportan trabajos donde se indican los beneficios de la aplicación de NPsAg en la geminación y el desarrollo vegetal señalando Cuong et al. (2023), la mejora en la calidad de brotes al igual que una reducción del tiempo de generación de raíces en *Limonium sinuatum* (L.) Mill. 'Blanco', así mismo Manokari et al. (2023), indica que en *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow' las NPsAg incrementaron la tasa de proliferación de brotes, biomasa, estomas funcionales, mejoraron enraizamiento y supervivencia de las plántulas aclimatadas finalmente, Andújar et

al. (2020), en su trabajo con *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. reporta una reducción en la contaminación de explantes en un 50 %, la mejora en el crecimiento del área foliar en un 560 % y un aumento de 180 % en la tasa de multiplicación relación brotes/explante.

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

4.1. Situación Problemática

Como parte de las actividades de la industria pesquera se tiene el procesamiento industrial de diversas especies, por ejemplo, el procesamiento de crustáceos como el camarón, Cabanillas et al. (2020), menciona que la descomposición de los desechos generados por estas industrias además de los malos olores puede generar un problema ambiental grave si no son tratados adecuadamente. Sarabia (2011), menciona que cuando los restos que generan este tipo de industrias son arrojados en las zonas de captura en altamar o en suelos aledaños a los sitios de procesamiento, contaminan y provocan la muerte de diferentes especies.

Por otra parte, *T. ionantha* Planch. enfrenta problemas por la deforestación y por la extracción ilegal (Sosa et al., 2012) de la que es objeto dado su valor ornamental, esto pone a sus poblaciones silvestres en peligro (Hernández et al., 2018), aunado a lo anterior es una especie que no cuenta con protocolo de propagación *in vitro* para su producción sustentable tanto para fines de conservación *ex situ* como para su comercialización.

Además, el uso de agentes como el quitosano y las NPsAg no han sido probados en el cultivo *in vitro* en esta especie vegetal con fines de mejorar la germinación y disminuir la contaminación, aspectos que se consideran fundamentales dentro de la micropropagación de plantas.

En el caso de esta investigación se trabajará en el plano tecnológico (Figura 12) pues la intención es generar una evaluación sobre el desempeño del quitosano y las NPsAg en el cultivo *in vitro* de una especie que se encuentra en riesgo por todos los problemas ambientales y sociales ya mencionados en este apartado.

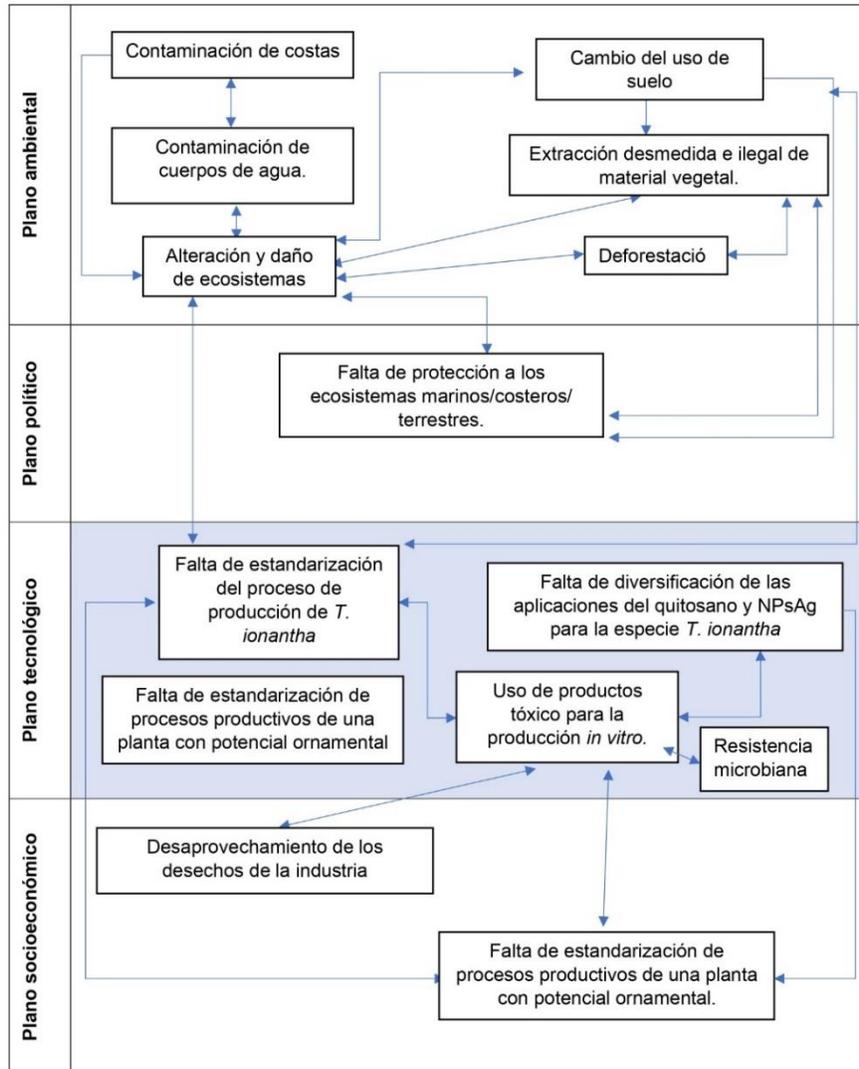


Figura 11. Situación problemática.

4.2. Delimitación del problema

El presente trabajo de investigación se centra en la evaluación del quitosano y las NPsAg aplicados como agentes desinfectantes de semillas, así como parte del medio de cultivo bajo sistema *in vitro* de *T. ionantha* Planch. con la finalidad de evaluar su impacto en la germinación y en el control fitopatológico en el cultivo *in vitro* en esta especie. El enfoque metodológico es cuantitativo empleando, métodos estadísticos básicos como pruebas de normalidad, análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples de medias; las potenciales limitaciones incluyen la carencia de antecedentes en la aplicación de quitosano y NPsAg en esta especie.

4.3. Planteamiento del problema

El presente trabajo se enfoca en la implementación del quitosano y NPsAg en el cultivo *in vitro* de *T. ionantha* Planch. con fines de contribuir a la generación de un protocolo de propagación *in vitro* que permita la conservación y la producción sustentable de esta especie vegetal que por su diversidad de usos especialmente el ornamental suele ser extraída de su medio natural; también busca diversificar los usos del quitosano y las NPsAg aplicados a una especie en la que no se tiene registro de su aplicación por lo que la falta de investigaciones específicas justifica la realización de este trabajo.

4.4. Vacío del conocimiento

La investigación, diseño y perfeccionamiento de protocolos de propagación *in vitro* de bromelias es limitada, solo basta analizar cómo algunos de los pocos trabajos publicados recientemente como el de Hernández et al. (2018) o el trabajo de Bertouklis y Panagaki (2022), basado en trabajos desarrollados desde la década de los años 80 y 90 lo cual indica la gran oportunidad de desarrollar temas de investigación innovadores en esta área del conocimiento.

Por otra parte, esta situación denota lo lento que se incrementa el flujo de información relacionada con la propagación *in vitro* de las bromelias comparado con otras familias botánicas cuya investigación sin duda, se incrementa constantemente creando una robusta base de conocimientos que sirven de andamiaje para los siguientes trabajos de investigación por lo anterior, resulta aún más difícil encontrar trabajos dirigidos a la generación de protocolos de propagación *in vitro* del género *Tillandsia* en comparación con otros géneros dentro de la familia Bromeliaceae.

Aunado a lo anterior, la mayoría de los trabajos direccionan sus objetivos a la investigación sobre el efecto de fitohormonas como las citoquininas, auxinas y giberelinas o bien desde el punto de vista nutricional, evaluando el efecto de diferentes dosis de macro y micronutrientes en el medio de cultivo, sin embargo, no se ha investigado el efecto del uso del quitosano y las NPsAg en el medio de cultivo o como desinfectante en *T. ionantha* Planch. en cambio, si se tiene antecedentes

sobre su eficiencia para el manejo fitosanitario y su función como bioestimulante en otros cultivos de tipo hortícolas.

4.5. Frontera del conocimiento

Dada la escasez de información específica de micropropagación de *T. ionantha* Planch. será importante generar antecedentes sobre el uso de quitosano y NPsAg en proceso de establecimiento *in vitro* de la especie, así mismo generar resultados sobre las posibles dosis y modos de aplicación en las semillas y en el medio de cultivo, y determinar su efecto en la germinación y en el control sanitario lo que permitirá decidir la viabilidad de integrar dichos agentes al desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* *T. ionantha* Planch. que es tan necesario para conservar *ex situ* la especie, así como su comercialización sustentable.

4.6 Justificación

El procesamiento industrial de crustáceos, especialmente el dedicado a la producción de camarón genera una gran cantidad de residuos, estimaciones de la FAO en el 2020 indican que tan solo en el año 2017 en México se produjeron 227,000 toneladas de camarón, por lo que se estima se originaron 100,000 toneladas de desechos toda vez que como señalan Cabanillas et al. (2020), entre el 48 al 60 % del peso total del camarón corresponde a la fracción no comestible, fracción que termina depositada en lugares inapropiados como vertederos no regulados o bien directamente en el mar provocando graves problemas medioambiental por lo que resulta importante el desarrollo de nuevas alternativas de uso como materia prima en diferentes industrias.

Desde hace cuatro décadas comenzaron con el estudio de la quitina que es la segunda sustancia orgánica de mayor abundancia en la naturaleza solo después de la celulosa (Velasco et al., 2019), y que además es el principal componente de los exoesqueletos de los crustáceos constituyendo entre el 20 al 58 % del peso seco de los desechos de los crustáceos sin embargo como menciona Hernández et al. (2009), su baja solubilidad limita su aplicación, no obstante cuando se realiza un proceso químico de desacetilación, se puede obtener quitosano el cual es soluble

en la mayoría de los disolventes orgánicos permitiendo su aplicación en diversas áreas.

Las múltiples investigaciones generadas hasta ahora han encontrado un sin número de aplicaciones que permiten por una parte dar una revalorización de los desechos del procesamiento industrial de crustáceos mediante la agregación de valor y por otra generar una alternativa de uso para evitar la contaminación medio ambiental.

En el caso de la agricultura existe la necesidad de investigar e incorporar nuevas fuentes biocidas de origen natural que permitan la transición hacia una agricultura más amigable medio ambientalmente, en su caso el biopolímero quitosano representa una interesante opción pues tiene una baja toxicidad en humanos, animales y en el medio ambiente además de que ha demostrado su utilidad y eficacia dentro de la producción agrícola en cultivos como cítricos, hortalizas, frutillas, papa, apio, manzana y plantas ornamentales como las orquídeas ya que se ha demostrado su eficacia como agente bactericida, fungicida, antiviral, como estimulador de crecimiento, inductor de resistencia, etc. (Lárez, 2008).

Existe un reto importante para la biotecnología agrícola pues una de sus vertientes está enfocada a la preservación de especies vegetales empleando la técnica de cultivo *in vitro* como forma de propagación de tejidos que aquellas plantas cuya existencia en la naturaleza como menciona Krömer et al. (2018), se ven amenazadas por la extracción ilegal y descontrolada o bien por la destrucción de su hábitat natural, siendo necesaria la propagación masiva y estandarizada para garantizar la salvaguarda de la planta en cuestión, tal es el caso de la bromelia *T. ionantha* Planch.

Es necesario generar investigación que permita por una parte probar la eficacia en el uso de productos con características como el quitosano para seguir extendiendo su uso en el área agrícola pero también para poder contribuir en la estandarización de protocolos de propagación de plantas que cumplan con el vigor e inocuidad necesaria para su exitosa propagación y conservación.

4.7 Pregunta de investigación

¿Cuáles concentraciones de quitosano y de NPsAg serán capaces de mejorar los índices de germinación, así como controlar agentes fitopatológicos en el cultivo *in vitro* de *Tillandsia ionantha* Planch?

V. HIPÓTESIS

La aplicación de quitosano y nanopartículas de plata como agente desinfectante de semillas previo a la siembra, y al medio de cultivo *in vitro* de *Tillandsia ionantha* Planch. promoverá beneficios en el proceso de germinación de semillas, así como una reducción en la incidencia de enfermedades fúngicas y bacterianas.

VI. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar si la aplicación de quitosano y nanopartículas de plata en el cultivo *in vitro* de *Tillandsia ionantha* Planch. benefician la germinación y la inocuidad del cultivo durante el proceso de germinación.

6.2 Particulares

- Establecer una prueba de viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. con el pretratamiento de las semillas y diferentes concentraciones de tetrazolio.
- Analizar la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo sobre la germinación y contaminación de semillas bajo sistema *in vitro* de *Tillandsia ionantha* Planch.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en la germinación, contaminación y supervivencia de las semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. dentro del proceso de lavado y desinfección previo a la siembra *in vitro*.
- Determinar si las nanopartículas de plata aplicadas al medio de cultivo líquido tienen efecto en la germinación, días a germinación, supervivencia y en el control sanitario en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. bajo condiciones *in vitro*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Lugar de estudio

La fase experimental del presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales adscrito al Área de Genética del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, el cual se encuentra ubicada en Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5, Chapingo, México y a la que corresponden las coordenadas geográficas 19°29'42.50"N y 98°53'11.28" O (Figura 12).

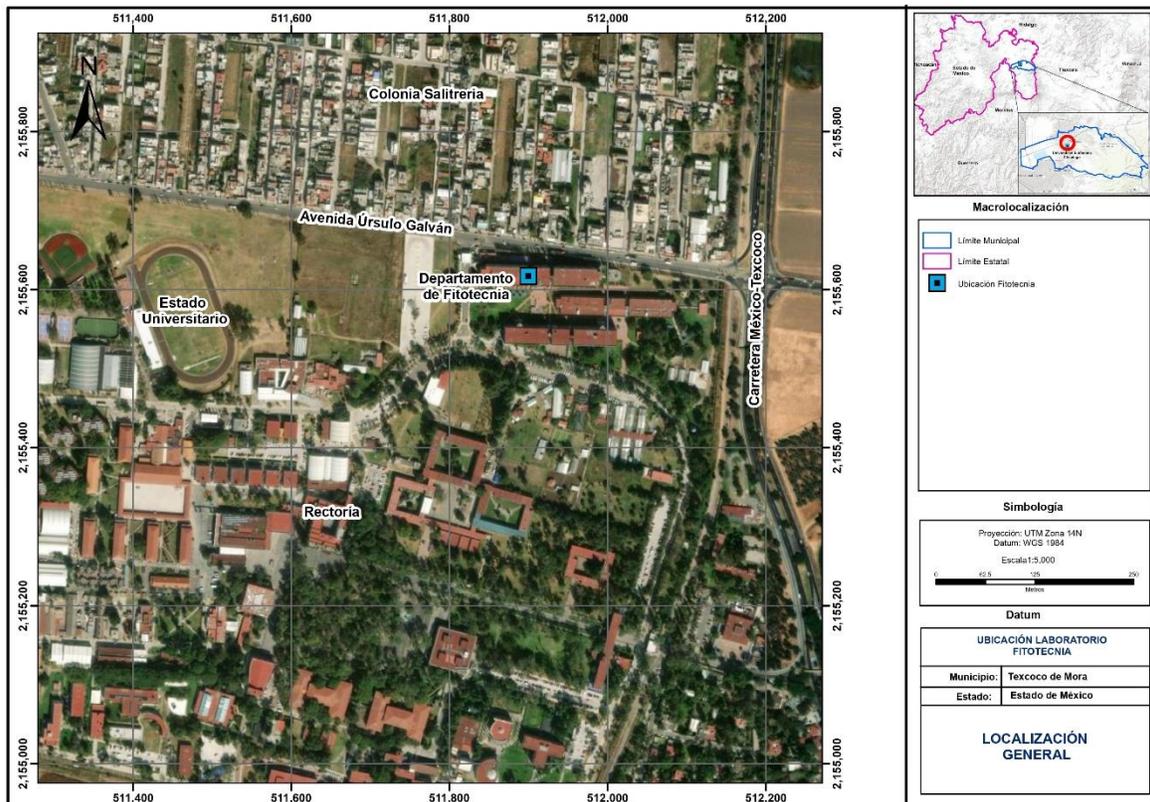


Figura 12. Localización geográfica del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma. Elaboración propia.

7.2 Material vegetal

Las semillas de *T. ionantha* Planch. empleadas en todos de los bioensayos fueron proporcionadas por el Centro Universitario de Investigación y Conservación de Bromelias Mexicanas (CUCIBROM), fueron recolectadas en marzo de 2022 y almacenadas a una temperatura ambiente promedio de 20 °C en recipientes plásticos con tapa de capacidad de 75 g.

7.3 Manejo de semilla

En el bioensayo del establecimiento de la prueba de viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas de *T. ionantha* Planch. con el pretratamiento de las semillas y diferentes concentraciones de tetrazolio no se lavaron las semillas.

En el resto de los bioensayos para facilitar la manipulación de las semillas se procedió a retirar el apéndice plumoso de cada semilla empelando tijeras de punta fina y pinzas, para posteriormente realizar los lavados correspondientes.

En el objetivo particular dos, analizar la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo sobre la germinación y contaminación de semillas bajo sistema *in vitro* de *T. ionantha* Planch. se elaboraron pequeños sobres de papel filtro, para después lavar las semillas dentro de la cámara de flujo laminar de acuerdo con la metodología de García et al. (2023), sumergiendo los sobres con semillas en tres soluciones y realizando tres enjuagues entre cada uno de ellas, la primer solución de desinfección tuvo una concentración de 10 % de alcohol con agua destilada estéril y los sobres permanecieron en ella por 10 minutos, la segunda también de 10 minutos se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % de la marca comercial Clorox® con agua destilada estéril y la tercera solución contenía 0.25 ml de plata coloidal en 100 mL de agua desionizada estéril.

Para el objetivo particular tres, evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en la germinación, contaminación y supervivencia de las semillas de *T. ionantha* Planch. dentro del proceso de lavado y desinfección previo a la siembra *in vitro* se empleó la técnica de lavado propuesta por Valdez (2023), que consistió en introducir las semillas una solución de alcohol al 70 % por tres minutos, seguido de un triple

enjuague con agua desionizada estéril, posteriormente, se empleó una solución de hipoclorito de sodio al 5 % de marca comercial con un tiempo de inmersión de 40 minutos, finalmente los sobres se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y se les agregó el tratamiento con NpsAg.

Para el objetivo particular cuatro, determinar si las nanopartículas de plata aplicadas al medio de cultivo líquido tienen efecto en la germinación, días a germinación, supervivencia y en el control sanitario en semillas de *T. ionantha* Planch. bajo condiciones *in vitro* se empleó la técnica de lavado de García (2023).

7.4 Medio de cultivo

Para establecer la prueba de viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas de *T. ionantha* Planch, no se empleó medio de cultivo.

Para, analizar la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo sobre la germinación y contaminación de semillas bajo sistema *in vitro* de *T. ionantha* Planch. se emplearon frascos de cristal tipo Gerber® etapa 2 y se colocó en cada uno de ellos 15 mL de medio de cultivo elaborado con sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) al 10 %, sacarosa 10 g.L⁻¹, quitosano grado alimenticio (250 y 500 g.L⁻¹) y quitosano grado reactivo marca Sigma-Aldrich® (250 y 500 g.L⁻¹) cuyo origen son exoesqueletos de camarón, con ≥75 % de desacetilado; como agente gelificante se empleó agar-agar Deiman® 5.5 g.L⁻¹, para ajustar el pH del medio de cultivo en 5.7 ± 0.1 se empleó el potenciómetro Conductronic® PC45 y soluciones normales de NaOH y HCl, para la esterilización de los medios de cultivo se utilizó autoclave Aesa CV250-A1 a 121°C a presión de 1.2 kg/cm² por 20 minutos.

En la evaluación del efecto de las nanopartículas de plata en la germinación, contaminación y supervivencia de las semillas de *Tillandsia ionantha* Planch emplearon frascos de cristal tipo Gerber® etapa 2 y se vertieron en cada uno 10 mL de medio de cultivo el cual fue formulado con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog, (1962) al 10 % de su concentración, sacarosa 10 g.L⁻¹, pH ajustado con el potenciómetro Conductronic® PC45 a 5.7 ± 0.1 y como gelificante se usó agar-agar Deiman® a una dosis de 5.5 g.L⁻¹. La esterilización se realizó con autoclave Aesa CV250-A1 a una temperatura de 121°C a presión de 1.2 kg/cm² por 20 minutos.

En el caso de la prueba para determinar si las nanopartículas de plata aplicadas al medio de cultivo líquido tienen efecto en la germinación, se emplearon tubos de ensayo y puentes de papel filtro de 10 por 1.7 cm, los tubos y los puentes se esterilizaron con autoclave Aesa CV250-A1 a una temperatura de 121°C y con una presión de 1.2 kg/cm² por 20 minutos; el medio de cultivo líquido estuvo constituido por sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) al 10 % y sacarosa 10 g.L⁻¹, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.1 con el potenciómetro Conductronic® PC45, dadas las recomendaciones del proveedor de Argovit™ (NPsAg) no se esterilizaron de los medios de cultivo bastando con servir el medio de cultivo dentro de la cámara de flujo laminar VECO GHFL-12.

7.5 Condiciones de incubación

El bioensayo de la prueba de viabilidad topográfica de las semillas *Tillandsia ionantha* Planch. se mantuvo bajo las condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura aproximada de 23 °C.

Para el resto de los bioensayos la temperatura del área de incubación donde se establecieron fue de 22°C ±1 y el régimen de fotoperiodo al que fueron sometidas las semillas fue de 16 horas luz e intensidad luminosa de 45 μmol m⁻² s⁻¹ suministrada por lámparas fluorescentes color blanco y 8 horas de oscuridad.

7.6 Tratamientos

Para la prueba de viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas de *T. ionantha* Planch, se aplicaron 12 tratamientos, la mitad de ellos incluía el sometimiento de las semillas a remojo con agua destilada estéril por 12 horas, así mismo empleando una lija de 1200 granos se sometió a escarificación física a la mitad de la muestra de semillas, finalmente 10 semillas fueron dispuestas en cada uno de los contenedores de plástico con tapa de adicionando dosis de tetrazolio al 0.1, 0.5 y 1 % (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos aplicados a las semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. establecidos en el ensayo para la prueba de tetrazolio.

Tratamiento	Remojo (12 horas)	Escarificación física	Tetrazolio (%)
T1	Si	Si	0.1
T2	Si	Si	0.5
T3	Si	Si	1
T4	Si	No	0.1
T5	Si	No	0.5
T6	Si	No	1
T7	No	Si	0.1
T8	No	Si	0.5
T9	No	Si	1
T10	No	No	0.1
T11	No	No	0.5
T12	No	No	1

Para analizar la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo sobre la germinación y contaminación de semillas bajo sistema *in vitro* de *T. ionantha* Planch. los tratamientos de los dos tipos de quitosano (alimenticio y grado reactivo) quitosano fueron adicionados como parte del medio de cultivo y se constituyeron de la siguiente forma (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos aplicados a las semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. basados en diferentes dosis de quitosano grado alimenticio y grado reactivo.

Tratamiento	Tipo de quitosano *	Dosis mg.L ⁻¹
T0	---	0
T1	QA	250
T2	QA	500
T3	QR	250
T4	QR	500

*QA=Quitosano grado alimenticio, QR: Quitosano grado reactivo

Por su parte, los tratamientos empleados para evaluar el efecto de las NpsAg como desinfectante antes de la siembra in vitro les fueron agregado la formulación de NPsAg (Argovit) que son elaboradas por VECTOR VITA LTP con sede en Novosibirsk, Rusia e importadas y distribuidas en México por BIOMANG. S.A.P.I. de C.V. con el nombre comercial NAGPET y bajo uso veterinario con registro de la SAGARPA Q-9692-033, Argovit provee una suspensión de NPsAg al 3 %, con vehículo cbp de 1.88 g/100 g de polivinilpirrolidona, vehículo cbp 0.94 g/100g de colágeno hidrolizado, el ingrediente activo correspondiente a la plata metálica fue de 0.18/100g empleando como vehículo 97 mL de agua destilada. El contenido de plata metálica en Argovit se utilizó para calcular las diluciones de NPsAG empleando agua desionizada estéril; las disoluciones resultantes tuvieron las concentraciones 0, 25, 100 mg.L⁻¹, además se emplearon dos tiempos diferentes de inmersión (5 y 20 minutos) de los sobres con semillas. (Cuadro 5), esto con base en las recomendaciones de la literatura consultada.

Cuadro 5. Tratamientos de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata y tiempos de inmersión, en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Tratamiento	NpsAg* (mg L ⁻¹)	Tiempo de inmersión (minutos)
T0	0	Sin inmersión
T1	25	5
T2	25	20
T3	100	5
T4	100	20

* NpsAg= Nanopartícula de plata.

Los tratamientos correspondientes al ensayo de NPs Ag aplicadas al medio de cultivo líquido se basaron en la aplicación de diferentes dosis (mg.L⁻¹) de Argovit™ (NPsAg) en medio y se muestra en el siguiente cuadro. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos a los que fueron sometidas las semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. para evaluar las nanopartículas de plata (NPsAg) en el medio de cultivo.

Tratamiento	NPsAg en el medio de cultivo (mg.L ⁻¹)
T0	0
T1	5
T2	10
T3	20
T4	40

* NpsAg= Nanopartícula de plata.

7.7 Diseño experimental

Para de la prueba de tetrazolio se empleó un diseño factorial: factor uno (remojo), con dos niveles con y sin remojo, factor dos (escarificación) con dos niveles, con y sin escarificación y factor tres (dosis tetrazolio) con tres niveles, 0.1, 0.5 y 1 %.

Por su parte para el bioensayo del análisis de la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo se usó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos cuya unidad experimental se compone de cinco frascos con cinco semillas cada uno y seis replicas.

En la evaluación de las NPsAg en el proceso de lavado el diseño experimental es completamente al azar con cinco tratamientos donde la unidad experimental corresponde a cinco frascos, donde a cada uno se le sembraron cinco semillas, y se establecieron seis replicas.

Para la aplicación de NPsAg al medio de cultivo *in vitro* el diseño experimental corresponde a un completamente al azar con cinco tratamientos cuya unidad experimental se compone de diez tubos de ensayo con una semilla en cada uno y tres replicas por tratamiento.

7.8 Variables respuesta

En la prueba de tetrazolio uno las variables evaluadas fueron por una parte el porcentaje de semillas que presentaron tinción en el área embrionaria y de la raíz, así como el patrón de tinción que presentes en las semillas, estas variables fueron evaluadas a las 24 y 48 horas después del establecimiento del bioensayo.

Para el resto de los bioensayos cada tercer día durante cuatro semanas se monitoreó el proceso de germinación que consiste en la emergencia del hipocótilo, así como los posibles casos de contaminación por hongos o bacterias, presencia-ausencia de necrosis (oxidación).

Las variables consideradas fueron el número de semillas germinadas, número de semillas oxidadas, número de semillas contaminadas por hongos o bacterias para poder determinar el porcentaje de germinación (PG), porcentaje de oxidación (PO), porcentaje de contaminación (PC), porcentaje de sobrevivencia (PV), días a germinación.

7.9 Análisis estadístico

El programa estadístico Minitab® 18.1 fue empleado para realizar todas las pruebas estadísticas de todos los bioensayos.

Se empleó la función arcoseno $\sqrt{x/100}$ para transformar y analizar los datos en porcentaje relativos a la tinción, germinación, contaminación y supervivencia, posteriormente, se revirtieron a su forma original en porcentaje para facilitar la discusión, se realizaron pruebas de normalidad para todas las variables, un análisis de varianza (ANDEVA) y cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas se procedió a realizar la prueba de comparación múltiple de medias Tukey ($p \leq 0.05$).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Viabilidad topográfica de tetrazolio en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Se evaluó el porcentaje de semillas que mostraron tinción en el área del embrión y de la raíz, el análisis de varianza ($p \leq 0.05$) mostró que únicamente el factor remojo (12 horas) tiene un efecto estadísticamente significativo en la tinción de las semillas con $p \leq 0.006$, las interacciones Tetrazolio-Escarificación física, Tetrazolio-Remojo, Escarificación física-Remojo no mostraron tener efecto estadísticamente significativo ($p \geq 0.05$) finalmente la interacción de los tres factores evaluados no mostró tener efecto estadísticamente significativo ($p \geq 0.293$) sobre la tinción de las semillas.

La gráfica de efectos principales para la tinción de las semillas (Figura 13) muestra que hay un mayor efecto o respuesta sobre la tinción cuando, si se realiza un remojo previo de 12 horas antes de aplicar tetrazolio en las semillas, aunque como ya se mencionó en el ANDEVA, las diferentes dosis de tetrazolio y la aplicación o no de escarificación física no tiene efecto sobre la tinción en la gráfica de efectos principales se puede observar que la dosis de tetrazolio de 0.01 % tiene mayor efecto que las dosis 0.5 y 1 % a sí mismo se puede observar que no realizar la escarificación física tiene un mayor efecto en la posible tinción de las semillas.

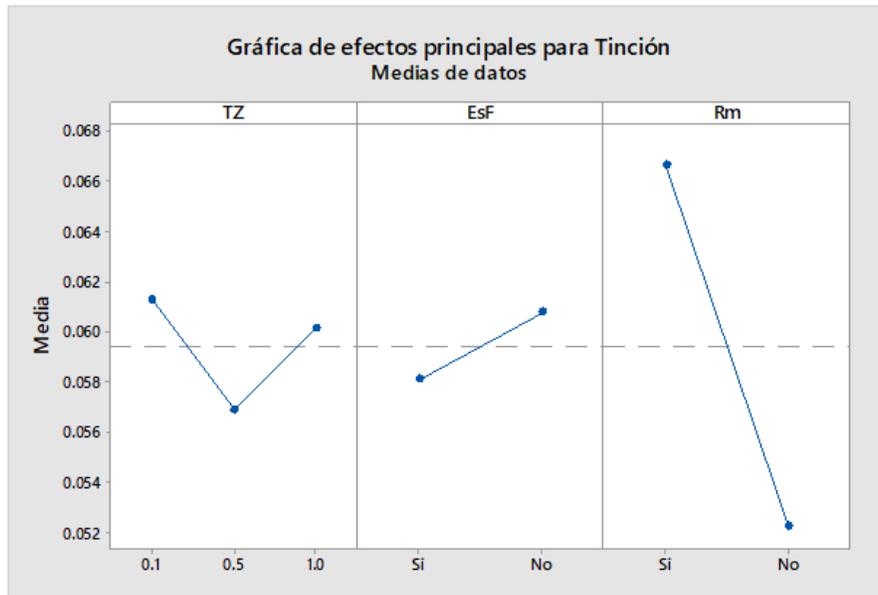


Figura 13. Grafica de efectos principales de la tinción de semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. para los factores dosis de tetrazolio, escarificación física y remojo. TZ=Tetrazolio, EsF=Escarificación física, Rm= Remojo

Topografía de tinción

Sobre la topografía de tinción de la semilla por efecto del tetrazolio se determinó que las partes teñidas corresponden al cotiledón, hipocótilo y raíz (Figura 14) así mismo, aunque la escarificación física no tiene efecto sobre la tinción por tetrazolio, resulta ser una técnica útil para facilitar la observación de la tinción de la estructura interna dado que, al ser una semilla de tamaño pequeño y al estar cubierta por la coma la visión del patrón de tinción se dificulta.

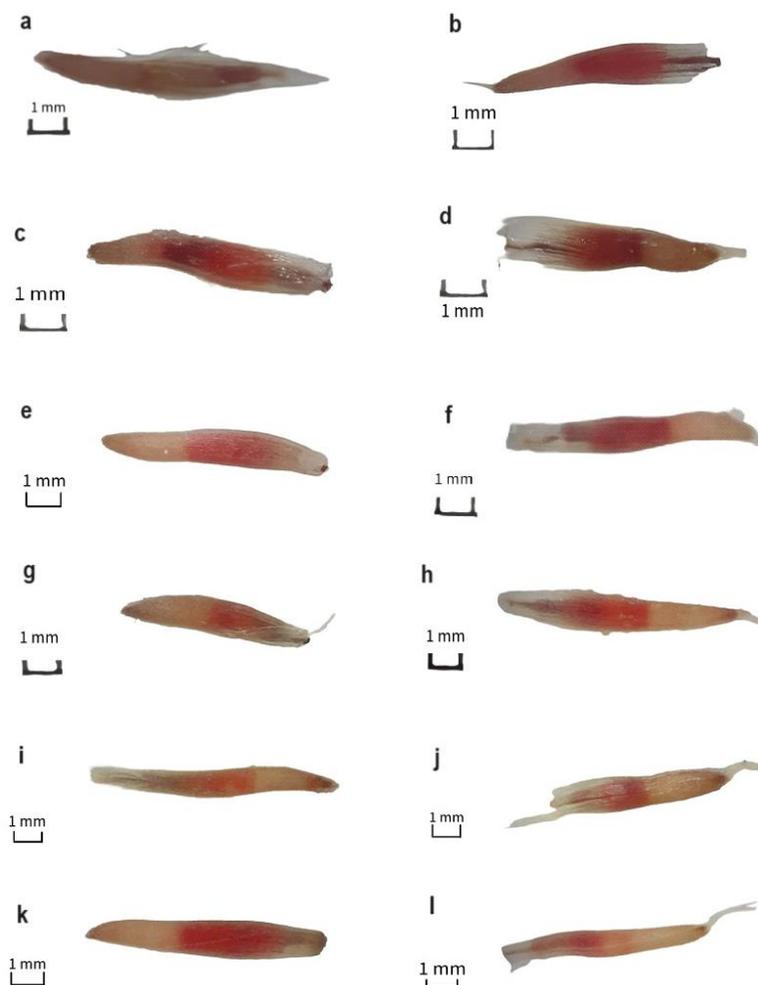


Figura 14. Patrón de tinción de semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. en los diferentes tratamientos. a) T1: Tetrazolio 0.1 N, con escarificación física, y remojo; b) T2: Tetrazolio 0.5 N, con escarificación física, y remojo; c) Tetrazolio 1 N, con escarificación física, y remojo; d) Tetrazolio 0.1 N, sin escarificación física, y remojo; e) Tetrazolio 0.5 N, sin escarificación física, y remojo; f) Tetrazolio 1 N, sin escarificación física, y remojo; g) Tetrazolio 0.1 N, con escarificación física, sin remojo; h) Tetrazolio 0.5 N, con escarificación física, sin remojo; i) Tetrazolio 1 N, con escarificación física, sin remojo; j) Tetrazolio 0.1 N, sin escarificación física, sin remojo; k) Tetrazolio 0.5 N, sin escarificación física, sin remojo; l) Tetrazolio 1 N, sin escarificación física, sin remojo.

Escala del patrón de tinción

Se reconocieron siete patrones de tinción en las semillas que incluyen semillas con ausencia total de tinción, tinción del área donde se ubica la raíz, semillas con tinción en raíz e hipocótilo, tinción en cotiledón e hipocótilo, tinción en cotiledón y raíz, semillas con tinción solo a nivel del cotiledón hasta aquellas semillas con tinción total de área embrionaria la cual incluye raíz, hipocótilo y cotiledón.

La tinción por efecto del tetrazolio indica que las semillas son viables, así mismo cuando no existe tinción o esta es apenas perceptible en colores rosados sin que la tinción sea homogénea se puede considerar que la semilla es no viable (Figura 15).

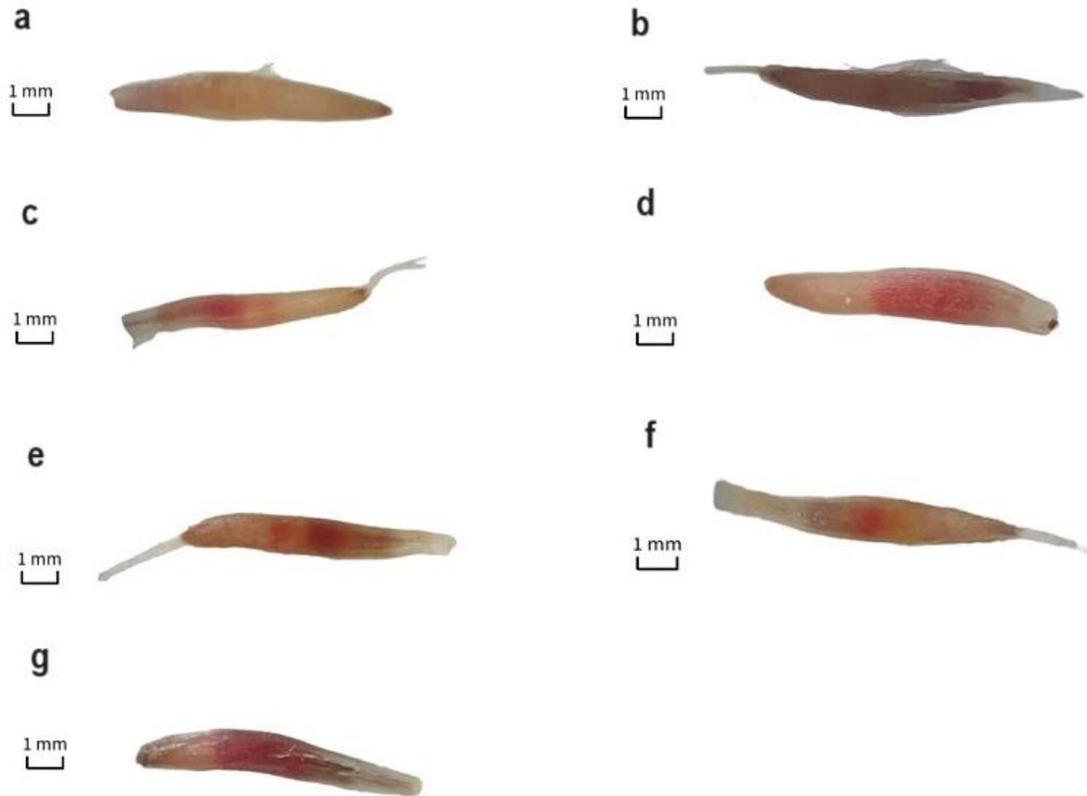


Figura 15. Patrón de tinción por tetrazolio en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Sobre los resultados obtenidos y a diferencia de lo reportado por Calderón (2019), donde indica que en *Espeletia* y en *Pentacalia ledifolia*, el factor más importante para la tinción lo constituye la concentración de tetrazolio pues, cuando se empleó tetrazolio al 1 % por 24 horas la viabilidad alcanzó el 76 y 80% respectivamente, esto en contraste con las semillas de *T. ionantha* Planch. en las que el factor principal que afectaba la tinción fue el sometimiento de las semillas a un proceso previo de remojo de 12 horas y no la concentración de tetrazolio.

Sobre la misma constitución anatómica de las semillas Calderón (2019), señala que en los casos de *Hesperomeles goudotiana*, *Cestrum buxifolium* y *Xylosma*

spiculifera, que se caracterizan ya sea por poseer una testa gruesa o con abundante endospermo, se requiere aplicar la prueba sobre los embriones directamente usando tetrazolio con una concentración de 1 % así mismo, el autor menciona que *Gaultheria anastomosans*, *Pernettya prostrata* y *Vaccinium floribundum* cuya testa es dura, se requiere cortar la testa y aumentar la concentración de tetrazolio a 1.5 % para obtener viabilidades de hasta el 40 % sin embargo, las semillas de *T. ionantha* Planch. no se presentan estas características anatómicas a nivel de semilla, facilitando así la aplicación de la prueba de tetrazolio directo en ella, sin requerir cortar la testa o escarificarla físicamente con fines de permeabilidad de la solución de tetrazolio en el tejido seminal.

En el trabajo desarrollado por Elizalde (2014), con *Hechtia perotensis* se determinó que al igual que en las semillas de *T. ionantha* Planch. las concentraciones de tetrazolio 0.2 y 1 % no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) sobre la tinción de los embriones permitiendo distinguir y calificar la vialidad de estas; en las pruebas de viabilidad con tetrazolio en *Hordeum vulgare* L., Grzybowski et al. (2012), también determinaron la conveniencia de preacondicionar las semillas con inmersiones directa en agua, a diferencia de las semillas de *T. ionantha* Planch. en cebada basta aplicar el pre-acondicionamiento únicamente por cuatro horas, además concluyeron que las concentraciones de tetrazolio eficaces en la tinción de las semillas de cebada son de 0.1 o 0.5 % lo cual coincide con los resultados obtenidos en *T. ionantha* Planch. donde la tinción de las semillas también se puede presentar en esas mismas concentraciones.

Mollo (2011), reporta que las semillas de *Hordeum muticum* y *Bromus catharticus* no mostraron ser sensibles a las concentraciones evaluadas (0.1, 0.5 y 1 %) mostrada viabilidad en cualquiera de las dosis lo que coinciden con el comportamiento *T. ionantha* Planch.

Es importante destacar que, como lo indican Elizalde et al. (2017), la aplicación de la prueba de tetrazolio depende de la experiencia del investigador para detectar la viabilidad de las semillas. Aunado a lo anterior, es necesario desarrollar protocolos

específicos para evaluar la viabilidad en semillas de bromelias, las cuales son poco documentadas en parte de acuerdo con los autores, al tamaño notablemente pequeño de las semillas de esta familia.

8.2 Análisis de la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo.

Los resultados del ANDEVA ($\alpha \leq 0.05$), para el análisis de la efectividad del quitosano grado alimenticio y reactivo sobre la germinación y contaminación de semillas bajo sistema *in vitro* de *T. ionantha* Planch, los resultados mostraron que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos para ninguna de las variables evaluadas sin embargo, para el porcentaje de germinación ($p > 0.463$) el mayor porcentaje de germinación fue obtenido por el T3 (quitosano grado reactivo, 250 mg.L⁻¹) con una media de 18 % y el menor porcentaje correspondió al T4 (quitosano grado reactivo, 500 mg.L⁻¹) con 14.5 % (Cuadro 7).

En los 31 días de duración de la prueba no se observó contaminación significativa por hongos o bacterias de las unidades experimentales de ninguno de los tratamientos, solo el tratamiento testigo presentó contaminación de 0.68 %, sin embargo, como ya se mencionó este porcentaje de infección en ningún sentido es significativo ($p > 0.426$) (Cuadro 7).

En promedio el 62 % de todas las semillas establecidas logró sobrevivir hasta los 31 días después de la siembra, perdiéndose el restante 38% por que la semilla no era viable o bien por que la semilla se oxidó y la adición de quitosano de grado alimenticio y reactivo no demostró generar diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia entre ninguno de los tratamientos ($p > 0.417$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza en los cinco tratamientos aplicados a semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Tratamiento	Germinación (%)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)
T0	15.00	0.68	57.33
T1	16.00	0	62.67
T2	16.50	0	64.67
T3	18.00	0	68.00
T4	14.50	0	58.00

T0 (Testigo, 0 mg. L⁻¹), T1 (Quitosano grado alimenticio, 250 mg.L⁻¹), T2 (Quitosano grado alimenticio, 500 mg.L⁻¹), T3 (Quitosano grado reactivo, 250 mg.L⁻¹), T4 (Quitosano grado reactivo, 500 mg.L⁻¹)

En la siguiente grafica (Figura 16) se muestra los porcentajes obtenidos en cada uno de los cinco tratamientos aplicados para las variables germinación, contaminación y supervivencia.

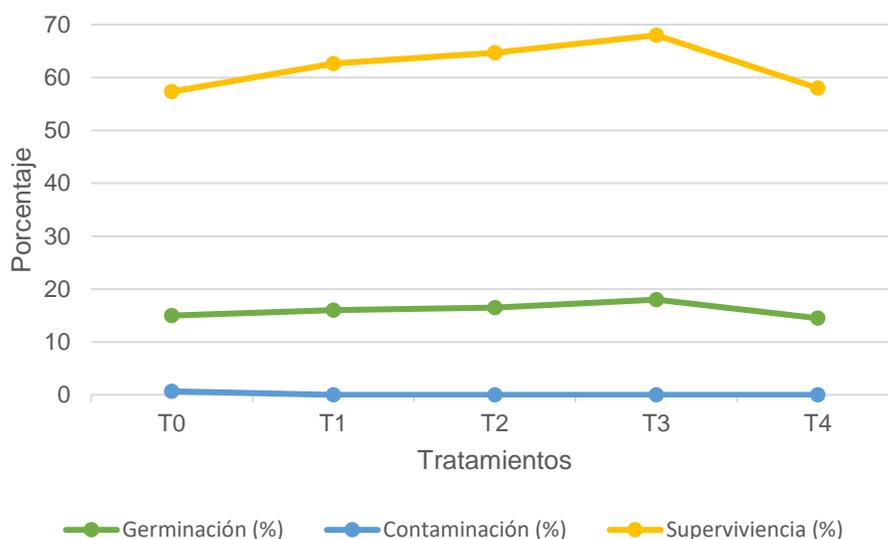


Figura 16. Porcentajes de germinación, contaminación y supervivencia.

Si bien el análisis estadístico determinó que no había evidencia de que el quitosano grado alimenticio y grado reactivo afectara las variables antes mencionadas, es posible detectar que las plántulas tratadas con quitosano muestran un mayor vigor que aquellas cuyo medio de cultivo no fue suplementado con quitosano en ninguna de sus presentaciones (Figura 17 y 18).

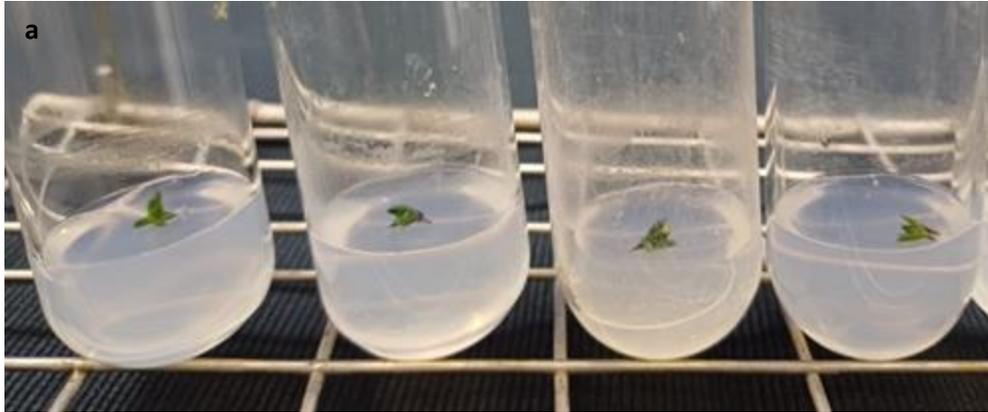


Figura 17. Comparación visual de plantas testigo. a) Tratamiento testigo (T0) cuyo medio de cultivo no contuvo quitosano en ninguna de sus modalidades aplicado en semillas *Tillandsia ionantha* Planch. a los 184 días después de la siembra.

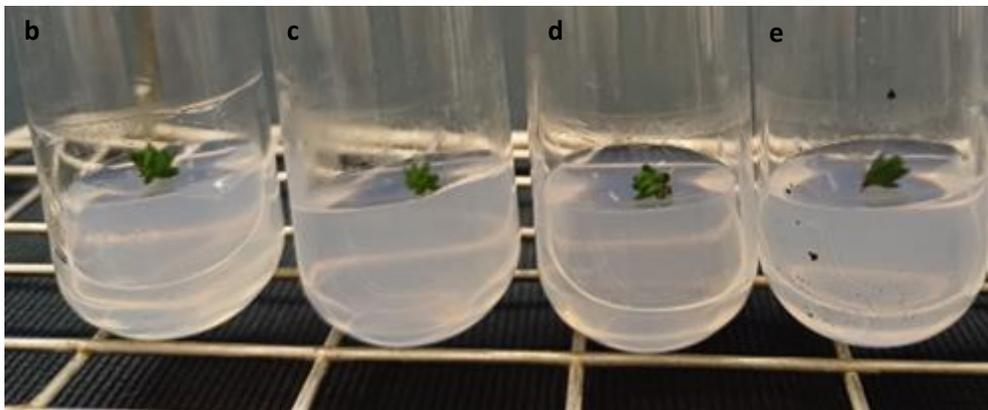


Figura 18. Efecto de la aplicación de quitosano comercial y reactivo al medio de cultivo en semillas *Tillandsia ionantha* Planch. a los 184 días después de la siembra. b) T1: quitosano grado alimenticio, 250 mg. L⁻¹; c) T2: quitosano grado alimenticio, 500 mg. L⁻¹; d) T3: quitosano grado reactivo 250 mg. L⁻¹; e) T4: quitosano grado reactivo, 500 mg.L⁻¹.

Se han difundido diversos estudios de investigación que examinan el proceso de germinación de semillas de cultivos relevantes en el ámbito hortícola o ecológico (Samarah et al., 2020; Ghule et al., 2021; Li et al., 2019; Abd El-Hack et al., 2020; Riseh et al., 2022) donde se ha evaluado concentraciones y diferentes pesos moleculares del quitosano (Costales et al., 2020, Boamah et al., 2023; Nge et al., 2006) sobre la germinación, sus resultados confirman el efecto bioestimulante del quitosano aumentando el porcentaje de germinación e incluso disminuyendo el tiempo medio de germinación, sin embargo, estos resultados contrastan con este bioensayo donde el quitosano no mostró tener efecto sobre la germinación de semillas de *T. ionantha* Planch. es probable que deban ensayarse nuevas dosis o

formas de aplicación para determinar si el quitosano es capaz de mejorar la germinación en esta bromelia.

Se han difundido diversos estudios de investigación que examinan el proceso de germinación de semillas de cultivos relevantes en el ámbito hortícola o ecológico (Samarah et al., 2020; Ghule et al., 2021; Li et al., 2019; Abd El-Hack et al., 2020; Riseh et al., 2022) donde se ha evaluado concentraciones y diferentes pesos moleculares del quitosano (Costales et al., 2020, Boamah et al., 2023; Nge et al., 2006) sobre la germinación, sus resultados confirman el efecto bioestimulante del quitosano aumentando el porcentaje de germinación e incluso disminuyendo el tiempo medio de germinación, sin embargo estos resultados contrastan con este bioensayo donde el quitosano no mostró tener efecto sobre la germinación de semillas de *T. ionantha* Planch. es probable que deban ensayarse nuevas dosis o formas de aplicación para determinar si el quitosano es capaz de mejorar la germinación en esta bromelia.

Sobre la contaminación se adjudica la ausencia de patógenos hongos y bacterias en todos los tratamientos a la acción conjunta de la eliminación del apéndice plumoso de las semillas, así como a la alta eficiencia de la técnica de lavado retomada de García et al. (2023), esta condición permitió evaluar la capacidad del quitosano para reducir o eliminar infecciones por fitopatógenos.

Si bien en este bioensayo no demostró tener efecto sobre la supervivencia si logró mejorar el vigor de las plantas lo cual coincide parcialmente con los trabajos de Bhaskara Reddy et al. (1999) y Arellano et al. (2020) en los que se logró mejorar el vigor de las plantas, será necesario extender el tiempo de evaluación en las plántulas de *T. ionantha* Planch. dado que su tiempo de crecimiento es lento para determinar si en un plazo mayor el vigor mostrado con los tratamientos de quitosano es suficiente para mejorar la supervivencia de las plantas.

8.3 Evaluación del efecto de las NPsAg en el proceso de lavado y desinfección previo a la siembra *in vitro*.

Los resultados de germinación del bioensayo tres, mostraron que los tratamientos T0 (testigo), T1 (25 mg.L⁻¹ y 5 minutos de inmersión), T4 (100 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión), son estadísticamente iguales, al presentar los mayores porcentajes de geminación, también se determinó que el T4 y T1 no presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al T2 (25 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) , finalmente los tratamientos que obtuvieron los porcentajes de germinación más bajo y que no presentan diferencias estadísticas significativas entre ellos corresponden a los T2 (25 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) y T3 (100 mg.L⁻¹ y 5 minutos de inmersión) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Respuestas observadas en los cinco tratamientos aplicados a semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Tratamiento	Germinación (%)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)	Días a germinación (DG)
T0	60 ^a	0.0 ^a	55.3 ^a	11.8 ^a
T1	46 ^{ab}	3.3 ^a	47.3 ^{ab}	10.58 ^a
T2	25.33 ^b	0.0 ^a	31.3 ^b	11.7 ^a
T3	28 ^b	0.0 ^a	34.7 ^b	10.2 ^a
T4	42.67 ^{ab}	3.3 ^a	42.7 ^{ab}	11.8 ^a

En las columnas las medias con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$)

Sobre la contaminación, la incidencia por bacterias y hongos fue mínima en la duración del bioensayo, únicamente los T4 y T1 (100 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión y 25 mg. L⁻¹ y 5 minutos de inmersión respectivamente), presentaron contaminación por hongos o bacterias (Cuadro 8) y el resto de los tratamientos no presentaron evidencia de agentes patógenos, por lo que el análisis estadístico confirmó que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para la sobrevivencia de las semillas, los tratamientos T0 (Testigo), T1 (25 mg.L⁻¹ y 5 minutos de inmersión) y T4 (100 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) (Cuadro 8) obtuvieron los mayores porcentajes de sobrevivencia y no tienen diferencias estadísticamente significativas entre ellos así mismo el T1 (25 mg.L⁻¹ y 5 minutos de inmersión) y T4 (100 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) no mostraron diferencias estadísticas significativas con el T3 (100 mg.L⁻¹ y cinco minutos de inmersión) y T2 (25 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) que obtuvieron los menores porcentajes de sobrevivencia.

Si bien el mayor porcentaje de sobrevivencia hasta la duración total del bioensayo (31 días) incluye al T4 (100 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) que representa el tratamiento con mayor dosis y tiempo de exposición a la solución con NPsAg, es indispensable señalar que estas causaron necrosis grave de tejidos de las semillas y de las plántulas resultantes siendo T2 (25 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) T3 (100 mg.L⁻¹ y 5 minutos de inmersión) y T4 (100 mg.L⁻¹ y 20 minutos de inmersión) los tratamientos que presentan los mayores daños hasta considerar que eventualmente estas plantas no lograrían sobrevivir dado el profundo daño de sus tejidos (Figura 19).



Figura 19. Efecto de diferentes concentraciones y tiempos de exposición de NPsAg en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch. a los 61 días de la siembra a) T0: sin inmersión; b) T1: 25 mg.L⁻¹, 5 min; c) T2: 25 mg.L⁻¹, 20 min; d) T3: 100 mg.L⁻¹, 5 min; e) T4 : 100 mg.L⁻¹, 20 min.

El número de días requerido para la germinación entre tratamientos no demostró tener diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tratamientos (Cuadro 6). Las diferencias en los porcentajes de germinación resultantes entre bioensayo podrían atribuirse a lo señalado por Salachna et al. (2019); Brunner et al. (2006) y Grün et al. (2019) citados por Guzmán et al. (2021), donde se menciona que el efecto de las NPsAg las plantas pueden variar de acuerdo al tipo de especie vegetal en el que se apliquen, el tamaño de partícula, la composición, la concentración y tiempo de exposición, entre otros factores; por otra parte los autores señalan que las NPsAg son capaces de promover el consumo acelerado de las reservas energéticas de la semilla por lo que en el caso de semillas de *T. ionantha* Planch. que se caracterizan por tener pequeñas dimensiones estas agotarían de forma acelerada sus reservorios producto a la exposición de las mayores dosis de NPsAg lo que afecta negativamente al proceso de germinación.

Ya que la presencia de agentes fitopatógenos fue mínima durante el bioensayo, lo que se puede atribuir a la interacción de las técnicas empleadas como fue la eliminación de la coma, la técnica de lavado citada; sin embargo, es importante tomar en cuenta que las NPsAg se han convertido en uno de los nuevos agentes más prometedores para la desinfección de superficies de explantes (Ahmad et al., 2020, Deshmukh et al., 2019, Hamad et al., 2020 citados por Cuong et al., 2023) pues como lo demuestran trabajos como el desarrollado por Tung et al., (2021), la aplicación de NPsAg (250 ppm) a explantes de crisantemo de cuatro semanas durante 15 a 20 minutos demostró ser óptima en el control de la contaminación. El control de la presencia de bacterias se debe principalmente según lo señalado por Gahlawat et al. (2016) y Barros et al. (2018) citados por Anees Ahmad et al. (2020), a la interacción directa de las nanopartículas con la pared celular de las bacterias ya que después de penetrar en el líquido citoplasmático, las nanopartículas pueden dañar la membrana, lo que puede causar la fuga de componentes celulares y finalmente, la muerte celular.

Dado que el mayor porcentaje de sobrevivencia lo obtuvo el tratamiento testigo y el daño a los tejidos del resto de los tratamientos fue severo se requiere como lo indica

Anees Ahmad et al. (2020), generar una investigación adecuada sobre la biocompatibilidad y la bioactividad de las NPsAg sobre las plantas esto implica conocer sobre la toxicidad química con base a la liberación de iones tóxicos así como el estrés que puede generar las nanopartículas por su superficie, el tamaño y la forma de las partículas (Saldivar et al. 2018). Es así como el efecto de las nanopartículas sobre las plantas puede ser positivo o negativo (Mónica y Cremonini, 2009 citados por Khot et al., 2012) por lo que antes de aplicar nanomateriales, es necesario obtener una comprensión completa de sus efectos fitotóxicos (Khot et al., 2012).

Sobre los días a germinación en este estudio se consideró como semilla germinada a aquellas semillas que mostraron una ruptura total del tegumento a nivel del hipocótilo mismo que se observa hinchado, tiene como base el trabajo desarrollado por Cecchifiordi et al. (2001), por lo que en este bioensayo, dicho fenómeno aconteció en promedio a los 11 días para todos los tratamientos, sin embargo, en el trabajo desarrollado por García et al. (2023), consideraron que la germinación de una semilla se presenta cuando la imbibición fue visible reportando que la germinación de sus tratamientos se dio dos días después de la siembra por lo tanto, se atribuye la diferencia entre los días a germinación al criterio con que se define la germinación en *T. ionantha* Planch.

8.4 Efecto de las NPsAg en el medio de cultivo líquido *in vitro* en semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Respecto al bioensayo cuatro, no se obtuvieron diferencias mínimas significativas ($p=0.567$) para la variable de germinación, sin embargo, los tratamientos que mostraron un mayor porcentaje de germinación corresponden a los tratamientos T1 (5 mg. L⁻¹) y T2 (10 mg. L⁻¹) los cuales contenían las menores dosis de NPsAg (Cuadro 9).

Cuadro 9. Respuestas de los tratamientos aplicados a semillas de *Tillandsia ionantha* Planch.

Tratamiento	Germinación (%)	Días a germinación	Contaminación (%)	Supervivencia (%)
T0	66.5	9.73	0	80
T1	84	9.72	0	73.3
T2	77	11	0	70
T3	63	9.10	0	63.33
T4	73.5	9.82	0	63.30

T0 (Testigo, 0 mg.L⁻¹ NPsAg), T1 (5 mg.L⁻¹ NPsAg), T2 (10 mg.L⁻¹ NPsAg), T3 (20 mg.L⁻¹ NPsAg), T4 (40 mg.L⁻¹ NPsAg)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la variable días a germinación ($p=0.283$), se encontró que el promedio de número de días requerido para la germinación fue de 9.87 días y que los tratamientos que requirió menos tiempo fue el T3 (20 mg. L⁻¹) con 9.1 días hasta la germinación (Cuadro 9).

Sobre la presencia de patógenos ninguno de los tratamientos mostró indicios de contaminación por hongos o bacterias durante el tiempo de observación (30 días) del bioensayo (Cuadro 9), para la variable de supervivencia no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.428$) sin embargo, los dos tratamientos con los mayores promedios corresponden a T1 (5 mg.L⁻¹), T0 (0 mg.L⁻¹) y T4 (40 mg.L⁻¹) dos de los cuales corresponden a las dosis menores de NPsAg y la tercera a la mayor dosis de todos los tratamientos (Cuadro 9).

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la germinación ni para la variable días a germinación, si se puede reconocer un incremento porcentual en la germinación para los tratamientos que contenían las dosis más bajas de NPsAg, estos resultados concuerdan con Guzmán et al. (2021) quienes indican que las NPsAg no afectaron los parámetros de germinación como la velocidad, tiempo medio o coeficiente de velocidad, en contraste Nejatzaheh (2021), encontró que en semillas de *Satureja hortensis* L. las NPsAg mostraron

tener efecto significativo sobre el porcentaje de germinación aun en condiciones de salinidad.

No se produjeron contaminaciones microbianas o fúngicas durante los 30 días de duración de la prueba, este resultado podría asociarse a una serie de condiciones que inician desde el retiro minucioso de la coma, lo cual reduce significativamente la posibilidad de introducir contaminantes en la siembra, una adecuada y eficiente técnica de lavado de las semillas mediante sobres de papel filtro retomada de García et al. (2023), e incluso a la técnica adecuada de siembra y manejo en el área de siembra, lo anterior se plantea dado que el tratamiento testigo tampoco sufrió contaminaciones de ningún tipo sin embargo, trabajos como los de Andújar et al. (2020), donde se dispersaron diferentes dosis de NPsAg sobre un medio semisólido creando una bicapa lograron reducir la contaminación de brotes al 50 % comparándolo con su testigo que presentó 80 % por otra parte otro ejemplo de alta eficiencia en la desinfección de medios de cultivo es el trabajo de Chávez et al. (2020), en el cual todos sus tratamientos lograron evitar la contaminación por microorganismos en un 100 % contrario a su tratamiento testigo que mostró una contaminación del 80 % otro ejemplo donde la implementación de las NPsAg en medio de cultivo no esterilizado tuvieron éxito fue en la investigación de Tung et al. (2021), donde hubo una ausencia total de contaminación por cuatro semanas en el medio que contenía NPsAg.

Las NPsAg no mostraron tener efecto en la supervivencia de las semillas germinadas, se encontró que en promedio el 70 % de las plantas fueron capaces de sobrevivir hasta el final de la prueba (30 días) indicando así un efecto neutro para esta variable en comparación con el trabajo de Manokari et al. (2023), donde la adición de NPsAg al medio de cultivo de *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow' demostró tener un efecto positivo sobre la supervivencia en la etapa de aclimatación.

IX. CONCLUSIONES

- La aplicación de remojo de 12 horas de las semillas de *T. ionantha* Planch. con agua destilada, tuvo efecto sobre la tinción del área embrionaria y radicular sin importar la concentración de tetrazolio empleadas en el bioensayo.
- Sobre la evaluación de los quitosanos comerciales, tanto de grado alimenticio como de grado reactivo, no evidenció impacto en la germinación, contaminación y supervivencia de las semillas de *T. ionantha* Planch. en cultivo *in vitro*, sin embargo, se observaron mejoras cualitativas, como incremento en el tamaño y la vitalidad de las plántulas tratadas con quitosano en comparación con aquellas cuyo medio de cultivo carecía de este suplemento.
- Respecto a la exposición de las semillas a NPsAg para su desinfección previo a la siembra *in vitro* mostró tener efectos adversos en ellas al aumentar el necrosamiento en los tejidos seminales a medida que se aumentó la dosis y tiempo de exposición a las NPsAg, además, no tuvo efecto favorable en el porcentaje de germinación, los días a germinación, la contaminación por patógenos ni la supervivencia de las semillas de *T. ionantha* Planch.
- La adición de NPsAg al medio de cultivo líquido no afectó el porcentaje de germinación, los días a germinación, la contaminación por patógenos ni la supervivencia de las semillas de *T. ionantha* Planch. sin embargo, la suplementación del medio de cultivo líquido con NPsAg sin esterilización con autoclave representa una alternativa en términos de ahorro de costos de operación.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda aumentar el tiempo de observación de las plantas tratadas con quitosano para determinar si los posibles efectos del quitosano se evidencian en fases posteriores del desarrollo de la planta, así mismo también podría probarse la aplicación de quitosano, pero en forma de nanopartícula. Por su parte, dado que el efecto de las NPsAg depende tanto de sus características fisicoquímicas, la concentración de la solución con NPsAg, la edad de las plantas, la especie vegetal, la forma de aplicación y las condiciones particulares de cada bioensayo se requiere generar más información que permitan determinar con precisión si las NPsAg tienen el potencial de ser integrados en el protocolo de propagación *in vitro* de *T. ionantha* Planch. así mismo es necesario probar dosis más bajas y tiempos menores de exposición que no generen necrosis en las semillas.

XI. REFERENCIAS

- Abd El-Hack, Mohamed E., Mohamed T. El-Saadony, Manal E. Shafi, Nidal M. Zabermaawi, Muhammad Arif, Gaber Elsaber Batiha, Asmaa F. Khafaga, Yasmina M. Abd El-Hakim, y Adham A. Al-Sagheer (2020). Antimicrobial and Antioxidant Properties of Chitosan and Its Derivatives and Their Applications: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules* 164: 2726–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>.
- Abdul Razak, N. Q., Md Yusoff, M. H., Abdul Aziz, W. N. A., Kamal, M. L., Hasan, S., Uyup, N. H., Zulkffle, M. A., Mohamed Hussin, N. A., y Shafie, M. H. (2023). Effects of silver nanoparticles on seed germination and seedling growth: A review. *Journal of the Indian Chemical Society*, 100(1), 100866. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100866>
- Ahmad Dar, S., y Abd Al Galil, F. M. (2023). Biodegradation, Biosynthesis, Isolation, and Applications of Chitin and Chitosan. En *Handbook of Biodegradable Materials* (pp. 677–717). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83783-9_72-1
- Ahmadkelayeh, S., Cheema, S. K., y Hawboldt, K. (2022). Extraction of astaxanthin from atlantic shrimp by-products using fish oil: Process optimization and operational parameter effects. *Journal of Cleaner Production*, 371(133609). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133609>
- Ahmed, S., y Ikram, S. (2017). Chitosan: derivatives, composites and applications. John Wiley y Sons.
- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A., y Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>
- Aliano, A., y Cicero, G. (2016). Encyclopedia of Nanotechnology. En Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9780-1>
- Ancona, J. J., Pinzón, J. P., Ortiz Diaz, J. J., Morillo, I. R., Tun-Garrido, J., Palma-Silva, C., y Till, W. (2021). Botanical history and typification in *the Tillandsia ionantha* complex. *TAXON*, 70(6), 1317-1326. <https://doi.org/10.1002/tax.12568>
- Andújar, I., González, N., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Escalona, M., y Concepción, O. (2020). Argovit™ silver nanoparticles reduce contamination levels and improve morphological growth in the in vitro culture of *Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. *SN Applied Sciences*, 2(12). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03948-9>

- Anis, M., y Ahmad, N. (Eds.). (2016). *Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement*. Springer Singapore. DOI: 10.1007/978-981-10-1917-3
- Arellano G., J., Enciso D., O., Flores P., A., Valencia D., S., Flores M., A., y Perea-A., I. (2020). Asymbiotic germination, effect of plant growth regulators, and chitosan on the mass propagation of *Stanhopea hernandezii* (Orchidaceae). *Botanical Sciences*, 98(4), 524-533. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2559>
- Bacchetta G., Bueno S. A., Fenu G., Jiménez A. B., Mattana E., Piotta B. y Virevaire M. (eds). (2008). *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp. <https://ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/4761/1/Archivol.pdf>
- Bautista B., S., Hernández L., M., Bosquez M., E., y Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* (Guildford, Surrey), 22(9), 1087–1092. [https://doi.org/10.1016/s0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/s0261-2194(03)00117-0)
- Bello B, J., y Spinoso C., J. (2022). Utilización de nanopartículas de plata en la micropropagación de plantas. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias Y Nanotecnología*, 16 (30), 1e-14e. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2023.30.69692>
- Benzing, D. H., y Dahle, C. E. (1971). The Vegetative Morphology, Habitat Preference and Water Balance Mechanisms of the Bromeliad *Tillandsia ionantha* Planch. *The American Midland Naturalist*, 85(1), 11–21. <https://doi.org/10.2307/2423907>
- Bertsouklis, K., y Panagaki, K. P. (2022). *In vitro* Germination and Propagation of *Dyckia brevifolia*, an Ornamental and Endangered Bromeliad. *Horticulturae*, 8(5), 390. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050390>
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., y Nonogaki, H. (2013). Germination. En *Seeds* (pp. 133–181). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4_4
- Bhaskara Reddy, M. V., Arul, J., Angers, P., y Couture, L. (1999). Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1208–1216. <https://doi.org/10.1021/jf981225k>
- Bhatia, S., y Bera, T. (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis. En *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 209–230). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00006-6>

- Bhojwani, S. S., y Dantu, P. K. (2013). Cellular Totipotency. En *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* (pp. 63–74). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_6
- Boamah, P. O., Onumah, J., Aduguba, W. O., y Santo, K. G. (2023). Application of depolymerized chitosan in crop production: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235(123858), 123858. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123858>
- Bustamante, K., Rocha, S. P., Sharry, S. E., Guerra, M. P., Y Niella, F. O. (2022). Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121(Especial 2), 102. <https://doi.org/10.24215/16699513e102>
- Cabanillas B., L. Á., Gutiérrez G., É. P., y Basilio H., J. (2020). Desechos de camarón: un coctel de oportunidades para la industria. *Novedades científicas*, 77(4). https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/online/X1_71_4_1274_DesechosCamaron.pdf
- Calderón H., M. (2019). Potencial de conservación ex situ de semillas de especies de páramo. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional biblioteca digital Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/75738>
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/410/1/111219220807102417.pdf>
- Castro G., C. G., Sánchez S., L., Gómez M., F. C., y Bello B., J. J. (2019). Exposure of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles *in vitro*: transport and accumulation. *Scientific Reports*, 9(1), 10372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46828-y>
- Cecchifiordi, A., Palandri, M., Turicchia, S., Gabrieleletani, y Di Falco, P. (2001). Characterization of the seed reserves in *Tillandsia* (Bromeliaceae) and ultrastructural aspects of their use at germination. *Caryologia; Giornale Di Citologia, Citosistemica, e Citogenetica*, 54(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/00087114.2001.10589208>
- Chávez G., J. A., Andrade R., M., Bello B., J. J., Rueda B., M. C., Guillén S., D., y Sainz A., M. de J. (2020). Nanopartículas de plata en el establecimiento *in vitro* de ápices de gladiolo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(4-A), 557. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.4-a.557>

- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) (2020, 16 abril). Produjo México 47 mil 664 toneladas de camarón en la temporada de captura 2019–2020: Agricultura. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/produjo-mexico-47-mil-664-toneladas-de-camaron-en-la-temporada-de-captura-2019-2020-agricultura>
- Comisión Nacional Forestal. (30 de diciembre de 2022). Se reduce en 26% la tasa anual de deforestación. <https://www.gob.mx/conafor/prensa/se-reduce-en-26-la-tasa-anual-de-deforestacion>
- Costales M., D., Falcón R., A. B., y Travieso H., L. (2020). Efecto de la masa molecular de quitosanos en la germinación y el crecimiento *in vitro* de soya. *Cultivos Tropicales*, 41(1), http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362020000100005&lng=es&tlng=es.
- Crini, G. (2019). Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1623-1643. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>
- Cruz, F. (2012). *Cultivo de tejidos vegetales* (Manual de prácticas). UNAM (Universidad Autónoma de México), 1. http://portal.cuautitlan.unam.mx/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manu_alprac.pdf
- Cuong, D. M., Mai, N. T. N., Tung, H. T., Khai, H. D., Luan, V. Q., Phong, T. H., Bui Van the Vinh, Phuong, H. T. N., Van Binh, N., y Tan Nhut, D. (2023). Positive effect of silver nanoparticles in micropropagation of *Limonium sinuatum* (L.) Mill. 'White.' *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02488-5>
- da Silva, C. B., Barbosa, R. M., Y Vieira, R. D. (2012). Evaluating Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) Seed Viability Using the Tetrazolium Test. *Seed Technology*, 34(2), 263–272. <http://www.jstor.org/stable/23433405>
- Dadlani, M., y Yadava, D. K. (Eds.). (2023). *Seed science and technology: Biology, production, quality*. (p. 430) Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-19-5888-5>
- Davey, M. (2017). Organogenesis. En *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (pp. 448–454). Elsevier.
- del Rocío C., E. M., Lagunes, L. Á., y Helguera, O. A. (2017). Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de*

- Desai, P., Desai, S., Rafaliya, R., y Patil, G. (2022). Plant tissue culture: Somatic embryogenesis and organogenesis. En *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 109–130). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00006-0>
- Elizalde C., V. (2014). Germinación de semillas y sobrevivencia de plántulas de tres especies de *Tillandsia* y dos de *Hechtia*. [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados] Repositorio Colegio de Postgraduados. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/2326>
- Espejo S., A., y López F., A. R. (2018). La familia Bromeliaceae en México. *Botanical Sciences*, 96(3), 533–554. <https://doi.org/10.17129/botsci.1918>
- Ezhova, T. A. (2003). Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. *Russian Journal of Developmental Biology*. (34) 197-204. <https://doi.org/10.1023/A:1024940130511>
- Falcón B., A., León Díaz, O., y Ortega, E. (2013). El quitosano en la interacción de las plantas con sus patógenos. (1ra. ed.). *Publicia*. https://www.researchgate.net/publication/311824392_El_quitosano_en_la_interaccion_de_las_plantas_con_sus_patogenos
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E., y Castro, P. M. L. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 43(9), 2221–2233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.034>
- Flores P., A., Bustamante M., A. B., Corona L., A. M., y Valencia D., S. (2015). Seed number, germination and longevity in wild dry forest *Tillandsia* species of horticultural value. *Scientia Horticulturae*, 187, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.003>
- Freire S., M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/263/html>
- García G., B., I., Valdez H., E. F., Rodríguez-De la O, J. L., Juárez H., M. de J., y Flores C., M. (2023). Pregerminative treatments in *Tillandsia ionantha* seeds to obtain seedlings under *in vitro* culture. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v16i1.2442>

- Garciglia, R. S. (2014). Deforestación. Saber Más: Revista de divulgación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, (14), 31-32.
- Ghule, M. R., Ramteke, P. K., Ramteke, S. D., Kodre, P. S., Langote, A., Gaikwad, A. V., Holkar, S. K., y Jambhekar, H. (2021). Impact of chitosan seed treatment of fenugreek for management of root rot disease caused by *Fusarium solani* under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Biotech*, 11(6), 290. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02843-3>
- González Z. L., y Orozco S. A. (1996). Methods for seed germination data analysis. An example: *Manfreda brachystachya*. *Botanical Sciences*, (58), 15 - 30. <https://doi.org/10.17129/botsci.1484>
- Grzybowski, C. R. de S., Ohlson, O. de C., Silva, R. C. da, y Panobianco, M. (2012). Viability of barley seeds by the tetrazolium test. *Revista brasileira de sementes* [Brazilian seed journal], 34(1), 47–54. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222012000100006>
- Guzmán B., G. A., Trejo T., L. I., Ramírez O., S. M., Salinas R., J., Bello B., J. J., Alcántar G., G., y Gómez M., F. C. (2021). Silver nanoparticles increase nitrogen, phosphorus, and potassium concentrations in leaves and stimulate root length and number of roots in tomato seedlings in a hormetic manner. *Dose-Response*, 19(4), 15593258211044576. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/15593258211044576>
- Hashimoto, M., Yang, Z., Koya, Y., y Sato, T. (2006). Chitosan. En *Non-viral Gene Therapy* (pp. 63–74). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/4-431-27879-6_6
- Hernández C., H., Águila A., E., Flores A., O., Viveros N., E.L., y Ramos C., E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, 22(3), 57-60. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-35212009000300012&lng=es&tlng=es.
- Hernández M., E. Rangel E., S.E., López P., Ma. C. G., Guerrero H., A., Ortiz G., G., y Martínez B., L. (2018) Germinación, viabilidad y regeneración *in vitro* de plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. *Revista fitotecnia mexicana*, 41(2), 99-106. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.99-106>
- Hernández, I. (2004). La quitosana: un producto bioactivo de diversas aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 97-110. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217916014>
- Hernández, Y., y González, M. E. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos*

- Jabeen, F., Younis, T., Sidra, S., Muneer, B., Nasreen, Z., Saleh, F., Mumtaz, S., Saeed, R. F., y Abbas, A. S. (2023). Extraction of chitin from edible crab shells of *Callinectes sapidus* and comparison with market purchased chitin. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.246520>
- Kale, S. K., Parishwad, G. V., y Patil, A. S. H. A. S. (2021). Emerging agriculture applications of silver nanoparticles. *Food & Agroforestry*, 3, 17-22. DOI 10.30919/esfaf438
- Kapali, D. (2023). Plant tissue culture: Definition, media, steps, types, uses. *Microbe Notes*; Sagar Aryal. <https://microbenotes.com/plant-tissue-culture-steps/>
- Khan, M., Khan, A. U., y Parveen, A. (2022). Nanoparticles in Plant Disease Management. In *Plant and Nanoparticles* (pp. 53–65). *Springer Nature Singapore*. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2503-0_2
- Khodakovskaya, M. V., de Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., y Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6(3), 2128–2135. <https://doi.org/10.1021/nn204643g>
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., y Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection* (Guildford, Surrey), 35, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.007>
- Krömer, T., Acebey, A., y Toledo A., T. (2018). Aprovechamiento de plantas epífitas: implicaciones para su conservación y manejo sustentable. En *De la recolección a los agroecosistemas: soberanía alimentaria y conservación de la biodiversidad* (Primera edición, pp. 175–196). Universidad Veracruzana. <http://libros.uv.mx/index.php/UV/catalog/download/QC018/513/673-1?inline=1>
- Kulak, V., Longboat, S., Brunet, N. D., Shukla, M., y Saxena, P. (2022). *In vitro* technology in plant conservation: Relevance to biocultural diversity. *Plants*, 11(4), 503. <https://doi.org/10.3390/plants11040503>
- Kumar, P. P., y Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. En *Plant Biotechnology and Agriculture* (pp. 131–138). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>
- Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Choudhary, R. C., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., y Saharan, V. (2018). Engineered chitosan-based nanomaterials:

Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.130>

Lárez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1-22. <https://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16830/1/udo-agricola2008.pdf>

Lascuráin, M., List, R., Barraza, L., Díaz Pardo, E., Gual Sill, F., y Maunder, M. (2009). Conservación de especies ex situ, En *Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio*. (pp. 517-544). Conabio. <http://www2.biodiversidad.gob.mx>

Lavorgna, A., Middelton, S. E., Whitehead, D., Cowell, C., y Payne, M. (2020). FloraGuard: tackling the illegal trade in endangered plants. *Royal Botanic Gardens*.

Li, B., Shi, Y., Shan, C., Zhou, Q., Ibrahim, M., Wang, Y., Wu, G., Li, H., Xie, G., y Sun, G. (2013). Effect of chitosan solution on the inhibition of *Acidovorax citrullina* causing bacterial fruit blotch of watermelon: Chitosans inhibit fruit blotch pathogen of watermelon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), 1010–1015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5812>

Li, R., He, J., Xie, H., Wang, W., Bose, S. K., Sun, Y., Hu, J., y Yin, H. (2019). Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.118>

Liu, J., Tian, S., Meng, X., y Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.12.019>

López M., L. I., Gutiérrez M., P., Bautista B., S., Jiménez G., L. F., y Zavaleta M., H. A. (2013). Evaluation of antifungal activity of chitosan in *Alternaria alternata* and in the quality of “Tommy Atkins” mango during storage. *Revista Chapingo. Serie: Horticultura*, XIX (3), 315-331. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.07.038>

Loyola V., V. M., y Ochoa A., N. (Eds.). (2016). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (1a ed.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>

Mahendran, D., Geetha, N., y Venkatachalam, P. (2019). Role of silver nitrate and silver nanoparticles on tissue culture medium and enhanced the plant growth

and development. En *In vitro Plant Breeding towards Novel Agronomic Traits* (pp. 59–74). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9824-8_4

Malerba, M., y Cerana, R. (2019). Recent applications of chitin- and chitosan-based polymers in plants. *Polymers*, 11(5), 839. <https://doi.org/10.3390/polym11050839>

Mancipe M., C., Calderón H., M., y Pérez M., L. V. (2018). Evaluación de viabilidad de semillas de 17 especies tropicales altoandinas por la prueba de germinación y la prueba de tetrazolio. *Caldasia*, 40(2), 366–382. <https://doi.org/10.15446/caldasias.v40n2.68251>

Manokari, M., Raj, M. C., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A. A., Joshee, N., y Shekhawat, M. S. (2023). Silver nanoparticles improved morphogenesis, biochemical profile and micro-morphology of *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow.' *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02502-w>

Manokari, M., Raj, M. C., Dey, A., Faisal, M., Alatar, A. A., Joshee, N., y Shekhawat, M. S. (2023). Silver nanoparticles improved morphogenesis, biochemical profile and micro-morphology of *Gaillardia pulchella* Foug cv. 'Torch Yellow.' *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02502-w>

Mao, X., Guo, N., Sun, J., y Xue, C. (2017). Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. *Journal of Cleaner Production*, 143, 814–823. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.042>

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., y Gutiérrez, E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 1, 53-58. <http://revencyt.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/rtcuru/n1/art06.pdf>

Márquez Martínez, J., López Peralta, M. C. G., Hernández Meneses, E., y Cruz Huerta, N. (2020). Regeneración *in vitro* de plantas de *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker por organogénesis directa. *Agrociencia* (1996), 54(6), 763–778. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i6.2180>

Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M., y Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.213>

Mollo, L., Martins, M. C. M., Oliveira, V. F., Nievola, C. C., y Figueiredo R., R. de C. (2011). Effects of low temperature on growth and non-structural

carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(1), 141–149. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9966-y>

Montes R., S., Márquez G., J., y Orozco S., A. (2012). Temperature and water requirements for germination and effects of discontinuous hydration on germinated seed survival in *Tillandsia recurvata* L. *Plant Ecology*, 213(7), 1069-1079. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11258-012-0066-9>

Mukhtar Ahmed, K. B., Khan, M. M. A., Siddiqui, H., y Jahan, A. (2020). Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production—a review. *Carbohydrate Polymers*, 227(115331). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115331>

Muraro, D., y Bonato e Negrelle, R. R. (2006). Aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich (Bromeliaceae). *Acta scientiarum. Biological sciences*, 28(2). <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v28i2.1011>

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Naranjo P., E. J., Acosta, L., Carlos, J., von Osten, R., y Nishizaki, S. (2009). *Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna*, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 247-276.

Nazir, K., Hassan, S. W., Khan, M. I., Elamin, K. M. A., y Niyazi, H. A. (2023). The use of ZnO NPs and Ag NPs along with sterilizing agents for managing contamination in banana tissue culture. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04623-w>

Nejatzadeh, F. (2021). Effect of silver nanoparticles on salt tolerance of *Satureja hortensis* L. during *in vitro* and *in vivo* germination tests. *Heliyon*, 7(2), e05981. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05981>

Nge, K. L., Nwe, N., Chandkrachang, S., y Stevens, W. F. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 170(6), 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.02.006>

Nwanna, L. C., Balogun, A. M., Ajenifuja, Y. F., y Enujiugha, V. N. (2004). Replacement of fish meal with chemically preserved shrimp head in the diets of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2, 79-83.

- Ovilla S. R., Gálvez D. L., y Rosas Q. R. (2017). La quitina: lo mejor de los desechos marinos – Ciencia UANL. CIENCIA UANL, 20(84). <https://cienciauanl.uanl.mx/?p=7170>
- Pabón B., D., Velázquez del V., M. G., Evangelista L., S., León R., R., y Hernández L., A. N. (2015). Chitosan effects on phytopathogenic fungi and seed germination of *Jatropha curcas* L. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 21(3), 241-253. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.10.051>
- Perea D., M., González, T., Campos Mosos, H. A., Guillot Monroy, G., y Cogua Suárez, J. E. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro: manual de prácticas de laboratorio*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79882>
- Pichyangkura, R., y Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>
- Pokhrel, L. R., Silva, T., Dubey, B., El Badawy, A. M., Tolaymat, T. M., y Scheuerman, P. R. (2012). Rapid screening of aquatic toxicity of several metal-based nanoparticles using the MetPLATETM bioassay. *The Science of the Total Environment*, 426, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.049>
- Pornpienpakdee, P., Singhasurasak, R., Chaiyasap, P., Pichyangkura, R., Bunjongrat, R., Chadchawan, S., y Limpanavech, P. (2010). Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. *Scientia Horticulturae*, 124(4), 490–499. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.02.008>
- Rahman, A., Al-Tawaha, M.S., y Al-Ghzawi, A.L. (2013). Effect of chitosan coating on seed germination and salt tolerance of lentil (*Lens culinaris* L.). *Research on Crops*, 14(2), 489-491. <https://eis.hu.edu.jo/deanshipfiles/pub106215042.pdf>
- Rajasekharan, P. E, y Sahijram, L. (2015). Conservación in vitro de germoplasma vegetal. En: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K. (eds) *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, Nueva Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_22
- Riseh, R. S., Hassanisaadi, M., Vatankhah, M., Babaki, S. A., y Barka, E. A. (2022). Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 998–1009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.109>
- Rosales, M. S. D., Jiménez, M. D. L. L. G., Gómez, C. R., Valles, C. Q., de León, S. D. D., Ordaz, S. J. M., y Balch, E. P. M. (2008). El cultivo *in vitro* como

herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53-62. <https://www.redalyc.org/pdf/674/67404109.pdf>

Ruttikay N., B., Krystofova, O., Nejd, L., y Adam, V. (2017). Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0268-3>

Saldivar, R. H. L., Argüello, B. M., De Los Santos Villarreal, G., y Reyes, I. V. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta Universitaria*, 28(2), 9-24. <https://doi.org/10.15174/au.2018.1575>

Samarah, N. H., AL-Quraan, N. A., Massad, R. S., y Welbaum, G. E. (2020). Treatment of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds with chitosan increases chitinase and glucanase activities and enhances emergence in a standard cold test. *Scientia Horticulturae*, 269(109393). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109393>

Sarabia, B. P. (2011). Aprovechamiento integral de crustáceos: obtención de quitina y quitosana de su cefalotórax y exoesqueleto por métodos ecológicos y de carotenoproteínas para consumo humano [Tesis de maestría]. Tesis digitales UNAM. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000676305>

Schmidt, L. H. (2007). Tropical forest seed. En *Tropical forestry*. Springer <https://doi.org/10.1007/978-3-540-68864-8>

Seguí, S. J. M. (2011). Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.

SEMARNAT. (2019). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, edición 2018. Semarnat. México. <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe18/index.html>

Sharma, M., Saini, L., Kumar, P., Panigrahi, S., y Dwivedi, P. (2023). Strategies for conservation and sustainable use of medicinal plants. En *Sustainable Development and Biodiversity* (pp. 251–263). Springer Nature Singapore.

Simões N., Miquelajáuregui M. M., Ordóñez L. U. y Ardisson H. P. L. (2010). Especies. En Durán, R. y Méndez, R. (Eds.). Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.

Sosa E., J. E. (2011). Aplicación de la Ley para el Combate del Tráfico Ilegal de Vida Silvestre en México: El caso de Charco Cercado. *Therya*, 2(3), 245–262. <https://doi.org/10.12933/therya-11-53>

- Sosa L., D., Chávez S., J. L., Mondragón C., D., Estrada G., J. A., y Ramírez V., P. (2012). Viabilidad y germinación de semillas de seis especies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de Oaxaca, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(SPE5), 37-42. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35nspe5/v35nspe5a8.pdf>
- Su, W., Xu, W., Polyakov, N. E., Dushkin, A. V., Qiao, P., y Su, W. (2023). Zero-waste utilization and conversion of shrimp shell by mechanochemical method. *Journal of Cleaner Production*, 425(139028). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.139028>
- Suárez P., I. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/server/api/core/bitstreams/5eacebea-f261-4e7b-8ca8-67f37ba9d7fb/content>
- Synowiecki, J., y Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43:2, 145-171 <http://dx.doi.org/10.1080/10408690390826473>
- Szymańska, E., y Winnicka, K. (2015). Stability of chitosan, A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1819–1846. <https://doi.org/10.3390/md13041819>
- Thomas, M. S., Koshy, R. R., Mary, S. K., Thomas, S., y Pothan, L. A. (2019). *Starch, chitin and chitosan based composites and nanocomposites* (pp. 19-42). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-03158-9_3
- Tung, H. T., Bao, H. G., Cuong, D. M., Ngan, H. T. M., Hien, V. T., Luan, V. Q., Bui Van The Vinh, Phuong, H. T. N., Nam, N. B., Trieu, L. N., Truong, N. K., Hoang, P. N. D., y Nhut, D. T. (2021). Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant: Journal of the Tissue Culture Association*. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10163-7>
- Tymoszuk, A. (2021). Silver nanoparticles effects on *in vitro* germination, growth, and biochemical activity of tomato, radish, and kale seedlings. *Materials*, 14(18), 5340. <https://doi.org/10.3390/ma14185340>
- Valdez, H. E. F., Rodríguez, V. R. C., Leyva, M. S.G., Rodríguez, de la O., Juárez, H. M. J., Mejía, M.J.M. (2023). Determination of a protocol for the *in vitro* germination of *Tillandsia usneoides*. *Acta horticulturae*, 1383, 91–98. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2023.1383.10>

- Varela, S. A., y Arana, M. V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. EEA Bariloche, INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_latencia.pdf
- Velasco R., J. F., Díaz N., G. C., Ramírez C., R. E., y Pérez C., L. E. (2019). Producción de quitosano a partir de desechos de camarón generados del procesamiento industrial. *Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, 4, 897-901. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/10/127.pdf>
- Velázquez, A., Mas, J. F., Díaz Gallegos, J. R., Mayorga Saucedo, R., Alcántara, P. C., Castro, R., Fernández, T., Bocco, G., Ezcurra, E., y Palacio, J. L. (2002). Patrones y tasas de cambio de uso del suelo en México. *Gaceta Ecológica*, (62), 21-37. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53906202>
- Véliz P., M. E. (2010). “Guía de Reconocimiento del Género *Tillandsia* de Guatemala”. [En línea] Consejo Nacional de Áreas Protegidas-CONAP. <https://www.caftadr-environment.org/wp-content/uploads/2016/04/guia-de-Reconocimiento-de-Tillandsia-2.pdf>
- Walsh, S. K., Wolkis, D., y Maunder, M. (2024). Plant Conservation. En *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 690–706). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00280-X>
- Xu, J., Zhao, X., Han, X., y Du, Y. (2007). Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi *in vitro*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.013>
- Yadav, M., Kaushik, B., Rao, G. K., Srivastava, C. M., y Vaya, D. (2023). Advances and challenges in the use of chitosan and its derivatives in biomedical fields: A review. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 5(100323), 100323. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100323>
- Yadu, B., Xalxo, R., Chandra, J., Kumar, M., Chandrakar, V., y Keshavkant, S. (2021). *Applications of nanomaterials to enhance plant health and agricultural production*. En *Plant Responses to Nanomaterials* (pp. 1–19). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36740-4_1
- Yan, N., y Chen, X. (2015). Sustainability: Don't waste seafood waste. *Nature*, 524(7564), 155–157. <https://doi.org/10.1038/524155a>
- Yurell, J. C. L., Fernández, G., Paneque, A. A., Nieto, O. M., Fernández, M., y Hidalgo, C. (2009). Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 10(1), 11-27. <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2009-hidalgo.pdf>

Zhou, Y., Guo, N., Wang, Z., Zhao, T., Sun, J., y Mao, X. (2021). Evaluation of a clean fermentation-organic acid method for processing shrimp waste from six major cultivated shrimp species in China. *Journal of Cleaner Production*, 294(126135). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126135>

APÉNDICE 1

Identificación del proceso de germinación de semillas y crecimiento de plántulas de la bromelia *T. ionantha* Planch. Vista con microscopio estereoscópico.

