



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO*
DE *Bromelia karatas* L. Y SU ANÁLISIS
FITOQUÍMICO PRELIMINAR.**

TESIS POR ARTÍCULO ESPECIALIZADO
Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

PRESENTA
FANNY JOSEFINA ALBARRÁN MONDRAGÓN

Comité de Tutores.

**Dra. Leticia Buendía González
Dr. Juan Orozco Villafuerte
Dr. Jorge Mulia Rodríguez**

Junio de 2016.



Índice general

	Pág.
Resumen	4
1. Introducción	5
2. Antecedentes	7
2.1 Riqueza y distribución del género <i>Bromelia</i>	7
2.2 Descripción botánica de <i>B. karatas</i>	7
2.3 Usos de las Bromelias	7
2.4 Cultivo de células y tejidos vegetales en la Familia Bromeliaceae.	8
2.5. Estudios fitoquímicos en <i>Bromelia karatas</i> .	9
3. Justificación	10
4. Hipótesis	11
5. Objetivos	12
5.1 Objetivo general	12
5.2 Objetivos particulares	12
6. Metodología	13
6.1 Tratamientos asépticos de hojas y semillas	13
6.2 Tratamientos de escarificación e inducción de germinación	13
6.3 Preparación del medio y condiciones del cultivo	14
6.4 Inducción de callo y/o respuestas morfogénicas	14
6.5 Determinación de la viabilidad de semillas de <i>B. karatas</i> .	14
6.6 Aclimatación de plántulas a condiciones <i>ex vitro</i>	15
6.7 Análisis estadístico	15

7. Resultados y discusión	16
7.1 Inducción de callo	16
7.2 Análisis de contenido de fenoles totales	16
8. Conclusiones	18
9. Perspectivas	19
10. Agradecimientos	20
11. Referencias	21
12. Artículo científico	26

Resumen

Bromelia karatas L “Timbiriche” es una especie utilizada como cerco vivo, en la elaboración de bebidas refrescantes y coadyuvante contra la diabetes. El objetivo del presente trabajo fue establecer cultivos *in vitro* de *B. karatas*. y analizar el contenido de fenoles totales. Para el establecimiento de cultivos *in vitro*, semillas y explantes foliares fueron desinfectadas y sembradas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con diferentes reguladores del crecimiento vegetal (RCV): 6-bencilaminopurina (BAP), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2.4-D) y tidiazurón (TDZ) bajo diferentes concentraciones. Se logró establecer el cultivo aséptico de semillas y hojas, así como la germinación bajo diferentes tratamientos de escarificación (66.25-100%). Las semillas sembradas en medio MS conteniendo 2 mg/L de 2,4-D con 1.0 mg/L de BAP formaron callo (78.57%), de apariencia compacta, verde y organogénico. Por otro lado, plántulas germinadas *in vitro* sirvieron como fuente de explantes foliares que se sembraron en medio para inducción de callo. Así mismo se determinó el contenido de fenoles totales por espectrofotometría UV-Vis, empleando como material de referencia el ácido gálico en diferentes tejidos derivados de los cultivos *in vitro* y especímenes adultos (frutos inmaduros, frutos maduros, hojas y callo). El material vegetal fue secado en estufa o por liofilización. Posteriormente, de la biomasa se obtuvieron extractos metanólicos por ultrasonificación (53 kHz, 40°C y 1 h) siendo el fruto maduro el tejido que significativamente mayor contenido de fenoles totales presentó (1110 mg EAG/100g biomasa PS). Estos compuestos son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes, útiles en la prevención y/o coadyuvantes de múltiples enfermedades asociadas a los procesos oxidativos. Los resultados proporcionan información para la aproximación en el uso de éste fruto en la medicina tradicional contra la diabetes dando alternativas de cultivos que permitan utilizar y conservar dicho recurso de manera sustentable.

Capítulo 1

Introducción

México ostenta el tercer lugar en cuanto a riqueza florística fanerogámica se refiere ^[1], aunado a una invaluable e histórica riqueza cultural ^[2-4]; tal estatus hace indispensable el desarrollo de análisis fitoquímicos conjuntamente con estudios agrosocioeconómicos que avalen y mejoren el manejo de los recursos, basado en el conocimiento de la especie vegetal y con ello lograr su uso sustentable.

Estudios realizados sobre *Bromelia karatas* L., comúnmente conocida como “Timbiriche”, indican que tiene importancia etnobotánica, se ha reportado su uso en la construcción de cercos vivos, así como su empleo ornamental, mientras que del fruto se elaboran bebidas refrescantes. También se utiliza en la medicina tradicional, a la especie se le ha atribuido actividad hipoglucémica, antiparasitaria, antioxidante, entre otras. Además, tiene importancia ecológica, evita la erosión y actúa como hábitat único para muchas especies animales. Adicionalmente, se vislumbra su aplicación agrosocioeconómica, ya que en algunos lugares la especie vegetal es vista con potencial de exportación en el mercado, por su fruto comestible ^[5-8].

En México pocos son los estudios que reportan la presencia del Timbiriche en el Estado de México ^[9]. Albarrán (2009) reporta la distribución de dicha especie en el Sur de Malinalco, donde el fruto se comercializa de manera local en el mercado de la comunidad, sin embargo, no existe producción formal y conocimiento de la importancia socioeconómica que esto puede representar ^[6]. Aunado a ello, en las nuevas generaciones ha disminuido el conocimiento del uso de la especie en la medicina tradicional y por consiguiente también en el consumo y uso de *B. karatas*, probablemente debido a la pérdida de identidad cultural (usos y costumbres) y la continua disminución de las poblaciones de dicha planta, que se ha observado en la comunidad, ya sea por adopción de nuevas tecnologías como las cercas de alambre espigado y/o el uso y habilitación de tierras para labores agrícolas o casa habitación ^[8,10]. Lo anterior también ha causado pérdida de conocimiento tradicional valioso, y muy probablemente la erosión genética del germoplasma de ésta especie ^[8].

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que representa una alternativa viable para el rescate de especies en peligro de extinción a través de su micropropagación, o de especies que se empleen en la medicina tradicional para lograr su

uso sustentable, para lograr esto último se requiere un sistema de proliferación masiva de células que retengan la capacidad de síntesis de los compuestos asociados a su uso en el folcklor medicinal. La técnica se basa en la totipotencialidad celular y el cultivo en condiciones asépticas bajo medios formulados con las necesidades del tejido o células en estudio ^[11-14].

Debido a lo expuesto anteriormente, es recomendable la generación de cultivos *in vitro* como material de estudio para la validación del uso medicinal de la especie *B. karatas*, y empleando técnicas biotecnológicas ofrecer una alternativa de producción masiva de los compuestos asociados a su valor medicinal, lo que redundará en evitar la sobreexplotación del recurso, validar la farmacología de la especie y con ello el rescate cultural por su uso medicinal, así como fomentar un manejo sustentable y por ende su conservación.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. Riqueza y distribución del género *Bromelia*

México tiene el 58% de familias de plantas con flor, a nivel mundial ^[1]. En México, la familia Bromeliaceae está representada por 18 géneros y 342 especies. De manera particular el Estado de México cuenta con 6 géneros y 40 especies registradas, de las cuáles 30 especies son endémicas de México, y 4 endémicas del Estado de México ^[15].

El género *Bromelia* al que pertenece *Bromelia karatas* L., comprende unas 50 especies nativas del Centro y Sudamérica, y las Antillas ^[16,17], de las cuales 5 se encuentran en México (*B. alsodes* H. St. John., *B. palmeri* Mez., *B. hemispherica* Lam., *B. pinguin* L. y *B. karatas* L.) ^[18]. La especie *B. karatas* L., se encuentra en bosques secos tropicales, bosques tropicales semi deciduos y dunas costeras ^[19].

2.2. Descripción botánica de *B. karatas* L.

Las Bromeliáceas se subdividen en 3 subfamilias Pitcairnioidae, Tillandsioidae y Bromelioidae ^[20]. La subfamilia Bromelioidae a la cual pertenece el género de *Bromelia karatas* L., se caracteriza por tener plantas terrestres, poseer flores con ovario ínfero, frutos en baya y margen foliar espinoso ^[16]. En la especie *B. karatas* L., el escapo es ausente, la inflorescencia posee pubescencia ferrugínea, su flor puede durar varios meses ^[16] y la planta cuenta con reproducción sexual y asexual ^[8]. El método más eficiente de propagar la especie es en forma vegetativa, a través de la separación de plantas o hijuelos que crecen por encima del suelo y en los costados de la planta madre ^[21-22].

2.3 Usos de las Bromelias

Muchos de los taxa de la familia Bromeliacea, son valiosos desde un punto de vista económico, ya que se ha reportado que pueden ser explotadas y comercializadas con diversos fines, y no solo a nivel local. Existen diversos ejemplos, entre ellos, su empleo en la obtención de fibras, alimento, forraje, combustible, medicina o como elementos ornamentales y ceremoniales ^[15, 23-28].

Lo anterior incluye a la especie *B. pinguin* L. ya que se le ha vislumbrado futuro promisorio con uso potencial del fruto industrial y alimenticio ^[8,29-32]. Sin embargo la mayoría de los agricultores cultivan y/o toleran “piñuelares” para cercar sus terrenos, y en la temporada de producción del fruto, que ocurre en los meses de Marzo a Julio, cosechan los frutos y se alimentan de ellos, sin darle mayor importancia a su manejo por su casi nula inversión económica, debido a que la piñuela es resistente a la sequía que medra en suelos marginales ^[8]. Es decir, el cultivo de la especie no tiene una producción formal, o al menos, no está bien documentada y entendida.

Respecto a la especie *B. karatas* L., se ha reportado principalmente, su uso alimenticio por el consumo de los frutos, como cerca viva y en la medicina tradicional se emplea para tratar la diabetes. Por otro lado, de nuestro conocimiento, no existen reportes de estudios sobre la germinación de las semillas, ni estudios de cultivos *in vitro* y/o farmacológicos que validen su uso y que permitan conocer, aprovechar y conservar a la especie vegetal ^[8, 31, 33].

2.4. Cultivo de células y tejidos vegetales en la Familia Bromeliaceae

El cultivo de células y tejidos vegetales (CTV) se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos ^[12]. Se basa en el concepto de “totipotencia”, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una planta completa ^[13]. El procedimiento general consiste en inocular en un medio de cultivo un fragmento de tejido vegetal, previamente tratado para eliminar todo microorganismo que se encuentre en su superficie. El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen al desarrollo del explante ^[11].

En la literatura se encuentran diversos reportes sobre cultivo de tejidos vegetales de la familia Bromeliácea. Destacando el uso del CTV para la micropropagación de las especies vegetales. La regeneración *in vitro* en diferentes especies de Bromelias ha sido descrita por Droste *et al.*, (2005) ^[34], López *et al.*, (2009) ^[35], Mercier y Barbante (1992, 1994) ^[36-37], Saucedo y Ramos (2008) ^[38], Roostika y Mariska (2003) ^[39] y Firoozabady y Moy (2004) ^[40]; vía embriogénesis y organogénesis en piña (*Ananas comosus*); en *Pseudoananas sagenarius* ^[41]; en especies del género *Tillandsia* ^[42]; en *Vriesea reitzii* ^[43]; en *Aechmea* “Little Harv” y *Tillandsia cyanea* ^[44]; y en *Nidularium fulgens* ^[45], en *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa* ^[46], entre otras (Tabla 1). Sin embargo, no existen reportes para *B. karatas* L.

Tabla 1. Cultivos *in vitro* reportados para la familia Bromeliaceae

Especie vegetal	Explante	Respuesta	Bibliografía
<i>Aechmea veitchii</i> <i>Racinaea crispa</i>	Semillas, Hojas y yemas apicales	Germinación y formación de callo	Calderon-Arias <i>et al.</i> , 2011 ^[46]
<i>Pseudoanana sagenarius</i>	Hojas	Callos y múltiples yemas	Avico <i>et al.</i> , (2006) ^[41]
<i>Nidularium fulgens</i>	Semilla	Raíces	Duarte <i>et al.</i> , (2009) ^[45]
<i>Aechmea</i>	Semilla	Brotos adventicios	Cueva <i>et al.</i> , 2006 ^[44]
<i>Tillandsia cyanea</i>	Plántula	Callo	Cueva <i>et al.</i> , 2006 ^[44]
<i>Vriesea scalaris</i>	Hojas	Proliferación de brotes adventicios, enraizamiento	Lopes da Silva <i>et al.</i> , 2009 ^[35]
<i>Tillandsia eizii</i>	Semillas	Proliferación de brotes adventicios y axilares, formación de callo y hojas primordiales y tejido vascular diferenciado	Pickens <i>et al.</i> , (2006) ^[42]
<i>Ananas comosus</i>	Corona (base y sección de las hojas y núcleo) longitudinal)	Proliferación de brotes axilares, estructuras globulares nodulares, embrión somático	Roostika y Mariska, 2003 ^[39]

2.5. Estudios fitoquímicos en *Bromelia karatas* L.

Existen pocos estudios fitoquímicos para *B. karatas*, se ha reportado la actividad antioxidante en frutos maduros ^[30], que muestran valores similares al antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT) o el antioxidante orgánico, ácido ascórbico. Por otro lado, se han encontrado proteasas en los frutos inmaduros, características de la familia Bromeliaceae ^[27], y una específica para *B. karatas*, “la karatasina” ^[47].

Capítulo 3

Justificación

En México pocos son los estudios que reportan la presencia de *Bromelia karatas* L. en el Estado de México ^[9]. En el Sur de Malinalco se observa en las nuevas generaciones que ha disminuido el conocimiento y por consiguiente el consumo y conservación de la especie. Lo anterior también ha causado pérdida de conocimiento tradicional valioso, y probablemente la erosión genética del germoplasma nativo la especie ^[8]. Por lo que es importante conservar la especie vegetal, con el fin de realizar estudios fitoquímicos, así como la validación farmacológica. Empleando técnicas biotecnológicas se puede ofrecer una alternativa de producción masiva de biomasa con síntesis de los compuestos asociados a su valor medicinal, lo que redundará en evitar la sobreexplotación del recurso, validar la farmacología de la especie y con ello el rescate cultural por su uso medicinal, así como fomentar un manejo sustentable y por ende su conservación.

Capítulo 4

Hipótesis

Bromelia karatas L. produce compuestos fenólicos que potencialmente estén asociados a su uso en la medicina tradicional, los cultivos *in vitro* pueden retener la capacidad de síntesis de éstos metabolitos secundarios.

Capítulo 5

Objetivos

5.1. Objetivo general

- ❖ Establecimiento de las condiciones *in vitro*, para la obtención de cultivos celulares de *Bromelia karatas* L.

5.2. Objetivos particulares

- ❖ Establecer las condiciones para la obtención de cultivos asépticos de explantes foliares y semillas de *B. karatas*.
- ❖ Evaluar diferentes tratamientos de escarificación para inducir la germinación de semillas de *B. karatas*.
- ❖ Evaluar distintos reguladores del crecimiento vegetal en semillas y explantes foliares provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas y de plantas adultas de *B. karatas*, en la inducción de callo y/o respuestas morfogénicas.
- ❖ Determinar el contenido de fenoles totales en frutos, explantes foliares y callo de cultivos *in vitro* de *B. karatas*.

Capítulo 6

Metodología

6.1. Tratamientos asépticos de hojas y semillas

Se colectaron hojas de especímenes adultos y frutos maduros e inmaduros de *Bromelia karatas* L., en la comunidad de “El Platanar”, Malinalco, Estado de México. Segmentos de hoja y semillas fueron desinfectados superficialmente con una solución de detergente comercial al 2 y 1 % (p/v) durante 15 y 20 min. respectivamente, seguido de su inmersión en una solución de etanol al 70% (v/v) por 30 s. Posteriormente las hojas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio en dos concentraciones (3.0 y 4.2% (v/v)) por 10 y 15 min., mientras que las semillas, posterior al proceso de escarificación, se sumergieron en una solución al 0.6 y 1.2 % (v/v) durante 10 y 20 min., y finalmente en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se lavaron 5 veces con agua destilada estéril.

6.2. Tratamientos de escarificación e inducción de germinación.

Las semillas obtenidas previo a su siembra, fueron sometidas a distintos tipos de escarificación (*mecánica*: remoción de un fragmento de la cubierta de la semilla; *térmica*: inmersión en agua a 30 y 100 °C, por 1 y 5 min; *hídrica*: inmersión en agua a temperatura ambiente por 24 h; y *química*: inmersión en solución de H₂SO₄ al 30 % y 98 %, por 1 y 5 min). A los 8 días de incubación, las semillas fueron bañadas con una solución de ácido giberélico (0.2 mg mL⁻¹; GA₃). La germinación fue registrada al observar la protrusión de la radícula. Se registró el porcentaje de contaminación, se seleccionó el tratamiento con menor porcentaje de contaminación para los posteriores experimentos.

6.3. Preparación del medio y condiciones del cultivo

Las semillas y fragmentos de hoja (0.5x0.5 cm) fueron sembrados en medio MS ^[48] a la mitad de su concentración conteniendo 1.0% (p/v) de sacarosa y 0.2% (p/v) de phytigel. A todos los medios elaborados, se les ajustó el pH a 5.8, con una solución de NaOH 0.1 N ó HCl 0.1 N, antes de su esterilización en autoclave a 121°C durante 20 min. Los cultivos fueron mantenidos a 25° ± 2°C con dos diferentes condiciones lumínicas, bajo un fotoperiodo de 16 h luz a una irradiancia luminosa de 50 μmol m⁻² s⁻¹ y en oscuridad total. Todos los medios fueron suplementados con agentes antioxidantes, 150 mg/L de ácido ascórbico, 100 mg/L de ácido cítrico, 500 mg/L de polivinilpirrolidona (PVP) y 250 mg/L de L-cisteína.

6.4. Inducción de callo y/o respuestas morfogenéticas.

Segmentos de hoja provenientes de especímenes adultos de *B. karatas*, y fragmentos de hoja derivados de plántulas germinadas *in vitro* fueron sembrados en medio de cultivo MS conteniendo 3.0% (p/v) de sacarosa, phytigel al 0.2% (p/v) y suplementados con diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/L) en combinación con bencilaminopurina (BAP; 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) o TDZ (Tidiazurón) (0, 0.1, 1.0 y 3.0 mg/L). Mientras que en los medios de cultivo para las semillas, las concentraciones usadas fueron: 2-4 D (0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) con BAP (0.0, 0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/L). Las respuestas morfogenéticas y/o callo fueron registradas a los 30 días de incubación, determinando la frecuencia de inducción, como el número de explantes formando la respuesta con respecto al total de explantes sembrados. Los cultivos que mostraron los más altos porcentajes de inducción fueron proliferados a través del subcultivo en medio fresco con la misma formulación de RCV.

6.5 Determinación de la viabilidad de semillas de *B. karatas* L.

10 semillas por triplicado fueron sumergidas en agua destilada durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente fueron disectadas longitudinalmente cuidando la integridad del embrión y colocadas en caja Petri cubiertas con una solución al 1 % (p/v) de cloruro de 2, 3, 5-trifenil-2H-tetrazolio (Tetrazolio) por 16 h y almacenadas en oscuridad total a 35°C. Inmediatamente después, se retiró el exceso de Tetrazolio con lavados de agua destilada. Finalmente, se expuso el embrión para su observación en microscopio estereoscópico y se evaluó su viabilidad ^[49].

6.6 Aclimatación de plántulas a condiciones *ex vitro*

Plántulas de 90 d de edad, con 6-12 cm de longitud, germinadas bajo condiciones asépticas en medio MS, fueron extraídas de los frascos de cultivo, lavadas con agua corriente para retirar el exceso de medio de cultivo y sembradas en macetas conteniendo una mezcla estéril de peat-moss con agrolita (1:1), cubiertas con bolsas de polietileno por 4 semanas, las cuales fueron regadas cada 3 d durante la primer semana y posteriormente cada 8 d.

6.7. Extracción y análisis del contenido de fenoles totales

Biomasa fresca de los cultivos *in vitro* (fragmentos de hoja) y frutos maduros e inmaduros de *B. karatas* fue secada en un horno de secado a 60°C por 72 h ó liofilizada. Muestras secas (100 mg) se sumergieron en metanol (50 y 100 mL) para la extracción de los compuestos fenólicos y concentrados en rotavapor. El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu ^[50]. Empleando el ácido gálico (AG) como estándar, se elaboró una curva patrón (1-20 mg L⁻¹), con un coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.9 . Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de biomasa seca (mg EAG 100g⁻¹).

6.8. Análisis estadístico

Todos los experimentos y las determinaciones se realizaron en lotes de 5 tubos conteniendo 5 semillas o fragmentos de hoja por tubo y por triplicado. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza usando el software estadístico NCSS. Para la comparación de medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Capítulo 7

Resultados y Discusión

7.1. Inducción de callo

Los valores más altos en la inducción de callo (78.57 y 76.7%) se registraron en las semillas creciendo en medios conteniendo (2 mg/L de 2,4-D con 1.0 mg/L de BAP) y (1.0 mg/L de 2,4-D con 1.0 mg/L de BAP) respectivamente. Los cultivos presentaron problemas de oxidación y en general, el crecimiento de la biomasa fue lento, para mitigar esto, los medios se enriquecieron con compuestos antioxidantes, entre ellos al ácido cítrico (100 mg/L), ácido ascórbico (150 mg/L), PVP (500 mg/L), L-cisteína (250 mg/L) y carbón activado (1g/L), aunque se redujo significativamente el proceso oxidativo, los cultivos siguieron mostrando la tendencia de oxidación. El callo generado fue de color verde y organogénico, mostrando la formación de numerosos brotes.

Por otro lado, explantes de hoja juvenil y hoja de plántulas de 7 días de edad, generadas en condiciones asépticas, fueron sembradas en medios conteniendo TDZ o 2,4-D y BAP para la inducción de callo. Ninguno de los tratamientos generó callo. Contrario a lo que se reporta en explantes de hoja en la especie *B. pinguin*^[51].

7.2. Análisis del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales en los diferentes explantes de la especie *B. karatas* varía desde 94 mg EAG/100g biomasa de peso seco (PS), en fruto seco en horno de secado, hasta 1110 mg EAG/100g biomasa PS, en fruto maduro liofilizado (Tabla 1). En términos generales, el mejor procedimiento de secado es por medio de liofilización. En el caso del callo, la variante que presentó mayor cantidad de fenoles es el callo pardo, esto podría deberse al estrés oxidativo^[52] que se observa. Finalmente el fruto maduro es el explante con la mayor cantidad de fenoles determinada, mayor al reportado para zumo del fruto verde o maduro de la misma especie (290 y 407 mg EAG/100g, respectivamente)^[31]. Sin embargo, menor al valor reportado en extractos de especies de importancia por su contenido de fenoles como *Camelia sinensis* (Té verde; 18 g EAG/100g biomasa)^[53]. Los resultados muestran que *B. karatas*, “Timbiriche” contiene una importante cantidad de fenoles que puede ser una primera aproximación en la confirmación del uso etnobotánico del fruto en la medicina tradicional. Estos compuestos son ampliamente conocidos por sus propiedades antioxidantes, útiles en la prevención y/o coadyuvantes de múltiples enfermedades asociadas a los procesos oxidativos, como enfermedades degenerativas incluyendo el cáncer y la diabetes. De acuerdo a los resultados del presente trabajo, se

puede sugerir a la población el consumo del fruto como coadyuvante en el tratamiento de los síntomas de enfermedades degenerativas. Finalmente éstos resultados podrían ayudar en el manejo y conservación de la especie ya que se obtuvo información que ayuda a conocer y manejar mejor el recurso, rescatando culturalmente a la especie en base a su uso medicinal/alimenticio, dando alternativas de aprovechamiento sustentable con el cultivo *in vitro*. Sin embargo, son necesarios posteriores estudios para el mejor conocimiento de los potenciales usos de la especie vegetal.

Tabla 2. Contenido de fenoles totales de frutos y explantes *in vitro* de *Bromelia karatas* L.

EXTRACTO	mg EAG/100g biomasa P.S *
FRUTO I. LIOFILIZADO	472 ± 2.6
FRUTO M. LIOFILIZADO	1,110±29.32
FRUTO I. SECO EN HORNO	94±1.2
FRUTO I. FRESCO	118.71 ±1.3
CALLO BLANCO	184±9.78
CALLO PARDO	205±0.2
HOJA VERDE	741±10
HOJA ETIOLADA	204±13.31

*Los valores representan el promedio y DS, n=3.

Capítulo 8

Conclusiones

Se obtuvo un 78.57 % de inducción de callo en el tratamiento conteniendo 2 mg/L de 2,4-D y 1.0 mg/L de BAP en semillas. Los resultados del análisis de contenido de fenoles totales en explantes de fruto maduro e inmaduro, callo y hoja de la especie *B. karatas*, evidencian importantes contenidos de fenoles, comúnmente asociados a la capacidad antioxidante de las especies vegetales, principalmente en el fruto maduro liofilizado que registró el mayor contenido de fenoles al compararse con los valores determinados para los otros tejidos evaluados. El método de secado por medio de liofilización en fruto tuvo mejores resultados en la obtención de fenoles. Los resultados del presente trabajo pueden representar una estrategia en la conservación y potencial uso de *B. karatas*.

Capítulo 9

Perspectivas

En base a los resultados del presente trabajo, es conveniente continuar con el análisis fitoquímico, para mejorar el proceso de extracción, identificar los compuestos en los extractos, y cuantificar la actividad antioxidante, información que podría ser de utilidad no sólo en el tratamiento de la diabetes, enfermedad de impacto mundial, sino en varias enfermedades asociadas a problemas oxidativos ayudando en la calidad de vida de los pacientes.

Capítulo 10

Agradecimientos

Agradezco a mi Dios que con infinita paciencia y amor me anima a ser mejor cada día. A mi familia. A mis tutores que han sido ejemplo, apoyo y guía durante el proceso y por supuesto agradezco la beca para los estudios de maestría, otorgada por CONACyT. Al financiamiento parcial a través del proyecto CONACyT de Ciencia Básica 167564. Así como a la comunidad de Malinalco y en especial a la familia Nieto por su disponibilidad y generosidad.

Capítulo 11

Referencias

1. Magaña, P. y J. Villaseñor. 2002. "La flora de México". Ciencias 66: 24- 26.
2. Toledo. 1996. "México: Diversidad de Culturas". Segunda edición. Cementos de México. México, D.F.
3. Miranda, F. 1948. "Observaciones botánicas en Tustepec, Oaxaca". Anales del Instituto de Biología. 19 (1): 1-136.
4. Huerta, C. 2002. "La herbolaria: mito o realidad". CONABIO. En: <http://conabio.gob.mx/institución/conabio-español/doctos/huerta.html>. (Diciembre del 2005).
5. Espejo-Serna, A. et al., 2007. "Bromeliad flora of Oaxaca, México: Richness and distribution". Acta Botánica Mexicana 81: 71-147.
6. Albarrán M., F. 2009. "Estudio florístico de los huertos familiares de la parte sur de Malinalco, Estado de México". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca. México.
7. Vázquez, E. 2007. "Plan para la cosecha sustentable de bromelias en la comunidad "ejido Guatimoc", Municipio de Cacahoatán, Chiapas". Universidad Autónoma de Chiapas 20p.
8. Orellana A. 2004. "Sondeo agrosocioeconómico y recolección de cultivares de muta (Bromelia sp.) en el oriente de Guatemala. (En red). Disponible en: http://www.icta.gob.gt/fpdf/recom/_rec_nat/%28INFORME%20SONDEO%20Y%20RECOLECCI_323N%20MUTA%20040105%29.pdf
9. Pérez J., J. y U. Madrigal. 2005. "Huertos, diversidad y alimentación en una zona de transición ecológica del Estado de México". Ciencia Ergo Sum 12: 54-63.
10. Konings, K. y J. Wolf. 1999. "Bromelias como productos no maderables. Aprovechar poblaciones naturales de bromelias en Los Altos de Chiapas. Ponencia presentada en el Seminario Retos y oportunidades para el aprovechamiento sostenible de especies no maderables en México y Centroamérica" Oaxaca, 23 al 26 de noviembre de 1999.

11. Barba, A., Amadeo, B., Luna, J., Romero. "Micropropagación de plantas". 1ª ed. 2001. Trillas. México. Pp.107.
12. Calva C.G., Ríos L.E. (1999). "Cultivo de callos y acumulación de Metabolitos Secundarios". EN: Rodriguez V.R., Calva C.G., Ramos R.E.G., Salazar M.A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
13. Ferl, R., Paul A. L. (2000). "Genome organization and expression". En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of plants. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
14. Street H. E. (1977). "Cell (suspension) cultures techniques". En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
15. Espejo-Serna, A. y A. López-Ferrari 2004. "Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism". Selbyana. 25(1): 33–86.
16. Plantencyclo.com (Modificado 22-01-04). "Las Bromeliaceas". (En red). Disponible en: [http:// www.plantencyclo.fre.fr/sp/bromel_general_qq.html](http://www.plantencyclo.fre.fr/sp/bromel_general_qq.html).
17. Davidse, G., M. Sousa S. y A. O. Chater, 1994. "Flora Mesoamericana. Volumen 6, Alismataceae a Cyperaceae". Universidad Nacional Autónoma de México, Missouri Botanical Garden, The Natural History Museum, Londres. México, D.F.
18. Coppens G y Leal F. 2001. "Bromeliaceae". (En red). Disponible en: [http:// www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/species%20Bromelia.htm](http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/species%20Bromelia.htm).
19. Ramírez IM, Carnevali G, ChiF. "Guía Ilustrada de las Bromeliaceae de la Porción Mexicana de la Península de Yucatán. México": Centro de Investigación Científica de Yucatán; 2005.
20. Black R. y Dehgan B. 1994. "Bromeliads". (En red). Disponible en: http://www.edis.ifas.ufl.edu/BODY_MG272.
21. Botany.com (Consulta 25-04-2012). "Bromelia". (En red). Disponible en: [http://www. Botany.com/bromeliad.html](http://www.Botany.com/bromeliad.html).
22. Faucon, P. (1998). Pinguin, "Piñuela". (En red). Disponible en: http://www.desert_tropicals.com/Plants/Bromeliaceae/Bromelia_pinguin.html
23. Benzing, D.H. (2000). "Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation". Cambridge University press. 675 pp.
24. Martínez M. 1990."Las plantas medicinales de México". Ed. Botas, México, D.F.

25. Guess V y Guess R. 2001. "Edible fruits of *Bromelia plumieri* and *Bromelia pinguin* from Chiapas". Journal of the bromeliad society. 51: 51-55.
26. Espejo-Serna, A. y López-Ferrari A. R.2003. "Las monocotiledóneas (Liliopsida) con potencial ornamental". En: Espejo-Serna, A. y A. López-Ferrari 2004. "Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism". Selbyana. 25(1): 33–86.
27. Payrol J, et al., "Purification and Characterization of Four New Cystein Endopeptidases from Fruits of *Bromelia pinguin* L." Grown in Cuba. Protein J. 2008; 27: 88-96.
28. Raffauf F, R. et al., "Antitumor plats: Diterpenoid and flavonoid constituents of *Bromelia pinguin* L." J. Org. Chem.1981; 46: 1094-1098.
29. Manetti, L. 2009. "Metabólitos secundários da família bromeliaceae", Universidade Paranaense. *Quim Nova*.32: 1885-1897.
30. Gonzalez-Salvatierra C, et al., "Antioxidant content in two CAM bromeliad species as response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest". J Plant Physiol. 2010; 167: 792-799.
31. Moyano D, et al., "Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y funcionalidad antioxidante de frutos de *Bromelia karatas* (Bromeliaceae)". Vitae. 2012; 19: 439-441.
32. Pio-León J, et al., "Physicochemical, nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia pinguin* L." Plant Foods Hum. Nutr.(2009); 64: 181-1887.
33. Duke J. "Duke's handbook of medicinal plants of Latin America". Boca Raton, U.S.: Taylor & Francis Group; 2009. 118 p.
34. Droste A, Machado da Silva A, Vieira A, Winck de Almeida J. 2005. "In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil". Brazilian Archives of Biology and Technology, 48 (5): 717-722.
35. Lopes da Silva A, Henz E, Bortoluzzi E, Reichert L, Quoirin M. 2009. "In vitro multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae)". Iheringia (Série Botanica), 64 (2): 151-156.
36. Mercier H, Barbante G. 1992. "In vitro multiplication of *Vriesea fosteriana*". Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 30: 247-249.

37. Mercier H, Barbante G. 1994. "In vitro culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest". *Journal Bromeliad*, 44: 120-124.
38. Saucedo S, Ramos L. 2008. "Propagación clonal in vitro de piña *Ananas comusus* L. Merr variedades *Champaka* y *Hawaiana*". *Laboratorio de Biotecnología UTEQ. Ciencia y Tecnología*, 1: 49-54.
39. Roostika I, Mariska I. 2003. "In vitro culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: Its utilization and prospect". *Buletin AgroBio*, 6 (1): 34-40.
40. Firoozabady E, Moy Y. 2004. "Regeneration of pinapple plants via somatic embriogenesis and organogenesis". *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 40: 67-74.
41. Avico EL, Rey HY, Mroginski LA. 2006. "Regeneración de múltiples yemas a partir de hojas de *Pseudoananas sagenarius*. Resumen": A-027. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes, Argentina. Fecha de acceso: 08 de junio de 2013. Disponible en: <<http://www.fundevap.org.br/Downloads/Bromeliaceae/Brom%E9lias%20-%20Import%E2ncia%20Ecol%F3gica%20e%20Diversidade.pdf>>.
42. Pickens K, Wolf J, Affolter J, Wetzstein H. 2006. "Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*". *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 42: 348-353.
43. Alves G, Vesco L, Guerra M. 2006. "Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture". *Scientia Horticulturae*, 110: 204-207.
44. Cueva A, Espinosa C, Jordan M. 2006. "Efficient in vitro multiplication of *Aechmea* "Little Harv" and *Tillandsia cyanea* Linden Ex K. Koch". *Propagation of Ornamental Plants*, 6 (4): 165-169.
45. Duarte P, Coelho V, Ferreira L, Paiva R, Pasqual M. 2009. "In vitro propagation of *Nidularium fulgens* Lem.". *Interciencia*, 34 (8): 593-596.
46. Calderon-Arias A, Restrepo A, Urrea A. 2011. "Morfogénesis in vitro a partir de yemas apicales y base de hojas de la especies de Bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*". *Actual Biol.* 33 (94):17-33.
47. Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., Cordoba, F. "Subunit structure of karatasin, the proteinasa isolated from *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural and biological chemistry*". 1990; 54 (1): 17-24.

48. Murashige T., Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.
49. Elizalde, C. V. (2014). Germinación de semillas y sobrevivencia de plántulas de tres especies de *Tillandsia* y dos de *Hechtia*. Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado de botánica. Campus Montecillo.
50. Aslan, M., Orhan, D.D., Orhan, N., Sezik, E. and Yesilada, E. (2007). "In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp *plicatum* capitulurns in streptozotocin-induced diabetic rats". *Journal of Ethnopharmacology* 109, 54-59.
51. Mesa, A.R. & Lajonchere, G., (1996). Micropropagación de *Bromelia pinguin* LINDL. (PIÑA RATON). *Pastos y forrajes*. 19:4. Disponible en: <http://payfo.ihatuey.cu/index.php/pasto/article/view/1005> (Enero del 2014).
52. L. R. Fukumoto, G. Mazza, Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, 2000, 3597-3604.
53. Mora A, Parra J, Chaverri JM, Aria ML (2013) Determinación de la capacidad antimicrobiana del té verde (*Camelia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(3): 247-253.

Capítulo 12

Artículo científico

-- Mensaje reenviado -----

De: Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente em@editorialmanager.com

Para: Juan Orozco-Villafuerte <jov202001@yahoo.com.mx>

Enviado: Jueves, 12 de mayo, 2016 20:51:22

Asunto: Submission Confirmation for GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE *Bromelia karatas* L.

Estimado(a) Dr. Orozco-Villafuerte,

Su contribución titulada "GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE *Bromelia karatas* L." se encuentra en revisión técnica por parte de la Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente

Si su manuscrito satisface los requerimientos técnicos y si se está dentro de la temática de la revista, se le asignará un número de control. Usted podrá seguir el proceso de su escrito ingresando como autor en la URL siguiente: <http://rchscfa.edmgr.com/>

Gracias por su contribución a nuestra revista.

Saludos cordiales.

Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente

Dear Dr. Orozco-Villafuerte,

Your submission entitled "GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE *Bromelia karatas* L." is currently under technical review by the Journal Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.

A reference number will be assigned to you manuscript, If the manuscript meets the technical requirements and it is deemed to be within the scope of the journal with regard to content.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on as an author to the following URL: <http://rchscfa.edmgr.com/>

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente

Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente
GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE Bromelia
karatas L.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS IN VITRO DE Bromelia karatas L.
Short Title:	GERMINACIÓN IN VITRO DE Bromelia karatas L.
Article Type:	Original study/Estudio original
Section/Category:	Silvicultura y manejo forestal / Forestry and forest management
Keywords:	seed viability; sustainable management; scarification
Corresponding Author:	Juan Orozco-Villafuerte, Ph.D Universidad Autonoma del Estado de Mexico MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma del Estado de Mexico
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fanny J Albarrán-Mondragón, Lic.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Fanny J Albarrán-Mondragón, Lic. Juan Orozco-Villafuerte, Ph.D Jorge Mulia-Rodríguez, Dr. Leticia Buendía-González, Dr.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Bromelia karatas L. is a native species of America that has use as an alternative in the diabetes mellitus treatment into traditional medicine and as living fence. Overexploitation of vegetal resources and changes in land use, have led to a drastic decline of this plant genetic reservoirs like home gardens. To induce in vitro germination, B. karatas seeds were superficially disinfected and scarified mechanical, thermal, hydric and/or chemically. Then seeds were inoculated on Murashige and Skoog (MS) medium and incubated in 2 different lighting conditions. The significantly higher germination percentage (100 %), was in the scarification treatment with the exposure of seeds to H ₂ SO ₄ (98 %, 5 min) regardless of lighting conditions. While treatment for the establishment of the aseptic cultures (0 % contamination) consisted in exposure of seeds and after scarification, to a solution of sodium hypochlorite at 0.6 % for 10 min. Additionally, in vitro cultures, it was possible to accelerate the germination time up to 36 times These results provide information that may form part of programs for sustainable use and conservation of this species.
Suggested Reviewers:	Elizabeth Murillo, Dr. Universidad del Tolima emurillo8@hotmail.com expert Juan Abreu Payrol, Dr. Universidad de la Habana payrol@ifal2.uh.cu expert José Chávez-Servia, Dr.

	Instituto Politécnico Nacional jchavez@ipn.mx expert
Opposed Reviewers:	

**GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO* DE
Bromelia karatas L.**

GERMINACIÓN *IN VITRO* DE *Bromelia karatas* L.

Fanny J. Albarrán-Mondragón¹, Juan Orozco-Villafuerte^{2*}, Jorge Mulia-Rodriguez¹ y Leticia Buendía-González¹

¹ Facultad de Ciencias, ²Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo Piedras Blancas Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Toluca, Estado de México. C.P. 50200. E-mail: jov202001@yahoo.com.mx. Tel: +52 722 2175109 and +52 722 2173890.

(*Autor para correspondencia)



Dra. Ma. Amparo Maxima Borja de la Rosa
Editor de la Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente.
Universidad Autónoma Chapingo
Presente

Los que suscriben *Fanny J. Albarrán-Mondragón, Juan Orozco-Villafuerte, Jorge Mulia-Rodríguez y Leticia Buendía-González*, hemos remitido para su publicación en la Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente editada por la Universidad Autónoma Chapingo a través de la Coordinación de Revistas Institucionales (CORI), el trabajo titulado *Germinación y establecimiento de cultivos in vitro de Bromelia karatas L., Germination and in vitro cultures establishment of Bromelia karatas L.*, para que de forma exclusiva lo edite, reproduzca, distribuya y transmita públicamente en cualquier forma o medio impreso y electrónico existente y por existir e incluir el artículo en índices nacionales e internacionales y/o bases de datos.

Para efectos de lo anterior *Fanny J. Albarrán-Mondragón, Juan Orozco-Villafuerte, Jorge Mulia-Rodríguez y Leticia Buendía-González* declaramos bajo protesta de decir verdad lo siguiente:

Que el trabajo de investigación mencionado es un trabajo totalmente original y de nuestra autoría.
Que no se está sometiendo total o parcialmente, en forma paralela a otras revistas y/o eventos científicos.
Que no ha sido previamente publicado de manera íntegra o parcial por ningún otro medio (electrónico o impreso), en revistas y/o eventos científicos.
Que una vez aprobada la publicación del artículo referido, transferimos con la firma de este documento los derechos patrimoniales de autor correspondientes a su utilización para las diversas formas de publicación de la Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente editada por la Universidad Autónoma Chapingo, sin cuyo permiso expreso no podrá reproducirse ninguno de los materiales publicados en la misma.

Asumimos la responsabilidad total del contenido y opiniones incluidas en el trabajo remitido, así como de las consecuencias derivadas de la publicación del mismo.

En virtud de lo anterior, manifestamos expresamente que **NO** nos reservamos el ejercicio de derecho alguno, en contra de la Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente editada por la Universidad Autónoma Chapingo, sus representantes o la Universidad misma.

Aceptamos de forma definitiva, el pago en especie por la aportación del artículo a la Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, el cual consta de un ejemplar del número publicado impreso donde se incluya el artículo, para cada uno de los autores.

Toluca, Estado de México, Mayo 12 de 2016

Atentamente

Dr. Juan Orozco Villafuerte



www.uaemex.mx/fquimica

GERMINACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO* DE

Bromelia karatas L

IDEAS DESTACADAS (HIGHLIGHTS)

- *In vitro* germination of *B. karatas*
- *In vitro* evaluation of scarification treatments in germination of *B. karatas* seeds
- The time of seed germination of *B. karatas* was significantly reduced by *in vitro* culture
- Plant Tissue Culture, alternative of conservation and management in *B. karatas*

RESUMEN

Bromelia karatas L. es una especie nativa de América, que se usa como alternativa en el tratamiento de la diabetes mellitus en la medicina tradicional, y en el cerco de terrenos. La sobreexplotación del recurso vegetal y el cambio en el uso del suelo han llevado a una drástica disminución en los reservorios fitogenéticos. Para inducir la germinación *in vitro*, semillas de *B. karatas* fueron desinfectadas superficialmente y escarificadas mecánica, térmica, hídrica y/o químicamente, posteriormente sembradas en medio Murashigue y Skoog (MS) e incubadas en 2 diferentes condiciones lumínicas. El tratamiento de escarificación con el mayor porcentaje de germinación (100 %) fue la exposición de las semillas a H₂SO₄ (98 %; 5 min) independientemente de la condición lumínica. Mientras que el tratamiento para el establecimiento de los cultivos asépticos (0 % de contaminación), consistió en la exposición de las semillas, posterior a la escarificación química, a una solución de hipoclorito de sodio al 0.6 % durante 10 min. Adicionalmente, en los cultivos *in vitro*, se logró acelerar el tiempo de

25 germinación hasta 36 veces, respecto a los datos reportados en campo. Estos resultados
26 aportan información, que puede formar parte de programas de aprovechamiento sustentable y
27 conservación de la especie.

28 **Palabras clave:** viabilidad de las semillas, manejo sustentable, escarificación

29
30
31

ABSTRACT

32 *Bromelia karatas* L. is a native species of America that has use as an alternative in the
33 diabetes mellitus treatment into traditional medicine and as living fence. Overexploitation of
34 vegetal resources and changes in land use, have led to a drastic decline of this plant genetic
35 reservoirs like home gardens. To induce *in vitro* germination, *B. karatas* seeds were
36 superficially disinfected and scarified mechanical, thermal, hydric and/or chemically. Then
37 seeds were inoculated on Murashige and Skoog (MS) medium and incubated in 2 different
38 lighting conditions. The significantly higher germination percentage (100 %), was in the
39 scarification treatment with the exposure of seeds to H₂SO₄ (98 %, 5 min) regardless of lighting
40 conditions. While treatment for the establishment of the aseptic cultures (0 % contamination)
41 consisted in exposure of seeds and after scarification, to a solution of sodium hypochlorite at
42 0.6 % for 10 min. Additionally, *in vitro* cultures, it was possible to accelerate the germination
43 time up to 36 times These results provide information that may form part of programs for
44 sustainable use and conservation of this species.

45 **Key words:** seed viability, sustainable management, scarification

46

47

INTRODUCCIÓN

49 *Bromelia karatas* L. conocida popularmente como Timbiriche, pertenece a la familia
50 Bromeliaceae, es una especie nativa de América con importancia etnobotánica, utilizada como
51 cerco vivo, especie ornamental, bebida refrescante y medicinal (Orellana *et al*, 2004).
52 Respecto a su empleo en la medicina tradicional, al fruto, se le ha atribuido actividad
53 antidiabética, antiparasitaria, antioxidante entre otras (Moyano *et al.*, 2012; Orellana *et al*,
54 2004) y se ha encontrado una proteasa en el fruto llamada karatasina (Montes *et al.*, 1990),
55 por otro lado; también tiene importancia agrosocioeconómica, por su comercio potencial del
56 fruto comestible (Orellana *et al*, 2004), así como ecológica, al evitar la erosión del suelo, y
57 como hábitat único para diversas especies animales (Benzing, 2000). Aun cuando se conoce
58 el uso del fruto como coadyuvante en el tratamiento contra la diabetes y otros padecimientos,
59 las poblaciones de *B. karatas* han disminuido drásticamente, principalmente del Centro y
60 Sudamérica (Orellana *et al*, 2004). Dada su problemática, es importante realizar esfuerzos
61 para su conservación y validación de su potencial uso.

62 El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser de gran utilidad en la conservación de
63 especies vegetales, cuyas poblaciones se encuentran en riesgo, dando alternativas de
64 conservación y aprovechamiento sustentable, así como herramienta para validar
65 fitoquímicamente el uso medicinal de las plantas. Durante los últimos años se han efectuado
66 diversos trabajos sobre la germinación de bromelias, los estudios muestran alta variabilidad en
67 cuanto a requerimientos de luz, temperatura, empleo de reguladores del crecimiento vegetal,
68 procesos de escarificación, y los tiempos y porcentajes de germinación de cada especie (7-
69 110 d y 8-99 %, respectivamente) (Coelho *et al.*, 2011; Klekailo *et al.*, 2012; Pompelli, 2006).
70 Esto puede atribuirse a que existen semillas que debido a las características físicas y

71 químicas del tegumento, presentan estructura o consistencia compacta e impermeable al agua
72 y gases, lo cual inhibe mecánica y químicamente la germinación (Cohelo *et al*, 2011). Para
73 superar esto, en condiciones naturales, las semillas de las bromelias terrestres son
74 dispersadas por mamíferos (Beisiegel & Mantovani, 2006; Motta-Junior & Martins, 2002). En
75 algunos estudios se ha demostrado la dormición por presencia de tegumentos impermeables
76 en la semilla, que parcialmente es removida por un proceso de escarificación al pasar éstas
77 por el tracto digestivo de los animales (Cohelo *et al*, 2011; Pompelli, 2006). En *B. karatas* no
78 existen reportes al respecto, por esta razón el objetivo del presente trabajo es conocer el
79 efecto de diferentes agentes y tipos de escarificación, que favorezcan la germinación de las
80 semillas de *B. karatas*, bajo condiciones de cultivo *in vitro*, para la obtención de biomasa
81 vegetal que posteriormente permitan la micropropagación de la especie y su estudio
82 fitoquímico.

83
84

MATERIALES Y MÉTODOS

85 **Material vegetal**

86 En Febrero de 2014 se colectaron infrutescencias maduras de especímenes reproductivos de
87 *B. karatas*, en la comunidad El Platanar Malinalco, Estado de México (19° 01' 58'' de latitud
88 norte y 99° 33' 24'' longitud oeste). Los frutos fueron lavados con agua corriente y detergente,
89 posteriormente fueron seccionados y las semillas fueron removidas, éstas últimas fueron
90 lavadas con agua corriente para retirar el exceso de pulpa y secadas a temperatura ambiente.
91 Las semillas obtenidas, previo a su siembra, fueron sometidas a distintos tipos de
92 escarificación (*mecánica*: remoción de un fragmento de la cubierta de la semilla; *térmica*:
93 inmersión en agua a 30 y 100 °C, por 1 y 5 min; *hídrica*: inmersión en agua a temperatura

94 ambiente por 24 h; y *química*: inmersión en solución de H₂SO₄ al 30 % y 98 %, por 1 y 5 min).
95 Posteriormente, las semillas fueron desinfectadas superficialmente al ser sumergidas en una
96 solución de detergente comercial al 1 % (p v⁻¹) durante 20 min, seguido de una solución de
97 alcohol etílico al 70 % (v v⁻¹) durante 30 s, posteriormente se sumergieron en una solución de
98 hipoclorito de sodio (0.6 y 1.2 % v v⁻¹, 10 y 20 min) y finalmente se lavaron 5 veces con agua
99 destilada estéril y sembradas en medio Murashige y Skoog (MS, 1962) a la mitad de su
100 concentración conteniendo 1.0 % (p v⁻¹) de sacarosa, 0.2 % (p v⁻¹) de phytigel, 500 mg L⁻¹ de
101 polivinilpirrolidona, 500 mg L⁻¹ de carbón activado y 250 mg L⁻¹ de cisteína. Todos los medios
102 fueron ajustados a pH 5.8 con una solución de NaOH 0.1 N, antes de su esterilización en
103 autoclave a 121 °C durante 20 min. Los cultivos fueron incubados con dos diferentes
104 condiciones lumínicas, bajo un fotoperiodo de 16 h luz a una irradiancia luminosa de 50 μmol
105 m⁻² s⁻¹ y en oscuridad total. A los 8 días de incubación, las semillas fueron bañadas con una
106 solución de ácido giberélico (0.2 mg mL⁻¹; GA₃). La germinación fue registrada al observar la
107 protrusión de la radícula.

108

109 **Germinación de semillas de *B. karatas***

110 Se estimaron los siguientes parámetros (Klekailo *et al.*, 2012): porcentaje de germinación

111 $G(\%) = \frac{N_{germ}}{N_{sem}}$; tiempo promedio de germinación $t = \frac{\sum ni \times ti}{\sum ni}$; tasa promedio de germinación $V =$

112 $\frac{1}{t}$; coeficiente de variación del tiempo de germinación $CV_t = \frac{DSt}{t} \times 100$; incertidumbre del

113 proceso de germinación $U = \sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i$; y la sincronización del proceso de germinación $z =$

114 $\frac{\sum_{i=1}^k C_{ni,2}}{C_{\sum ni,2}}$.

115

116 **Determinación de la viabilidad de semillas de *B. karatas***

117 10 semillas y por triplicado, fueron tomadas al azar para evaluar su viabilidad mediante la
118 prueba de Tetrazolio (Elizalde, 2014).

119
120 **Aclimatación de plántulas a condiciones *ex vitro***

121
122 Plántulas de 90 d de edad, con 6-12 cm de longitud, germinadas bajo condiciones asépticas
123 en medio MS, fueron extraídas de los frascos de cultivo, lavadas con agua corriente para
124 retirar el exceso de medio de cultivo y sembradas en macetas conteniendo una mezcla estéril
125 de peat-moss con agrolita (1:1), cubiertas con bolsas de polietileno por 4 semanas, las cuales
126 fueron regadas cada 3 d durante la primer semana y posteriormente, cada 8 d.

127

128 **Análisis estadístico**

129 Todos los experimentos se realizaron en lotes de 5 tubos conteniendo 5 semillas y por
130 triplicado. Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza usando el software estadístico
131 Statgraphics (Centurión XVI.II). Para la comparación de medias se empleó la prueba de Tukey
132 ($p \leq 0.05$).

133

134

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

135 De todos los tratamientos evaluados para la desinfección superficial y escarificación de las
136 semillas, el tratamiento que registro el significativamente menor porcentaje de contaminación
137 (0 %) y el significativamente mayor porcentaje de germinación (100 %), fue la escarificación
138 química (H_2SO_4 98%, 5 min) e independientemente de la condición lumínica de incubación
139 (Tabla 1). En este tratamiento, la germinación se observó a partir de los 0 y hasta los 5 d de

140 cultivo, que representa 36 veces menos que en campo (~180 d, dato obtenido de entrevistas a
141 campesinos), mientras que los otros tratamientos incluyendo el control, mostraron un rango en
142 el tiempo de germinación de 0-70 d. La germinación oscilo entre el 25-100%, siendo marcada
143 la respuesta en la escarificación térmica (100°C) y química (H₂SO₄ 98% y 30%). En general,
144 las plántulas, mostraron un desarrollo adecuado, con la generación de hojas verdes, largas
145 con márgenes espinosos, y distribuidas en roseta (Fig. 1). Los resultados obtenidos en el
146 presente trabajo se encuentran dentro de los rangos reportados para la otras especies de la
147 familia Bromeliaceae, el rango del tiempo de germinación a temperaturas de 25-35°C oscila
148 entre los 3-110 d, y los porcentajes de germinación, se reportan con 30-99 %, en semillas
149 incubadas en cajas plásticas con papel humedecido con H₂O destilada, en una cámara de
150 crecimiento (Anastacio & Santana, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Da Rosa & Ferreira, 1998; Da
151 Silva *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2010; Pickens *et al.*, 2006; Sosa-Luría *et al.*, 2012).

152 Insertar Tabla 1

153 Respecto al tratamiento de escarificación que registró los mayores porcentajes (H₂SO₄ al 98
154 % por 1 min), es similar a lo reportado para *Bromelia balansae* (Coelho *et al.*, 2011), mientras
155 que en *Bromelia serra* no favoreció la germinación (Klekailo *et al.*, 2012), y contrario a lo
156 observado en *Ananas ananassoides*, bajo el mismos tratamiento, la germinación fue menor
157 (76%), lo cual puede deberse a que las semillas de *B. karatas*, *B. balansae* y *B. serra*
158 presentan dormancia tegumentaria, mientras que en *A. ananassoides*, no se reporta esta
159 característica (Anastacio & Santana, 2010). Es importante mencionar que posterior a 2 meses
160 de almacenamiento, las semillas muestran daños importantes en la cubierta por la exposición
161 al H₂SO₄, debido a ello se disminuyó el tiempo de exposición (1 min) en el proceso de
162 escarificación en los posteriores experimentos.

163 Insertar Figura 1

164 En cuanto a los parámetros del proceso de germinación determinados en *B. karatas*, los
165 valores del coeficiente de variación en el tiempo (CVt) así como de la incertidumbre de
166 germinación (U), que se traduce en un periodo prolongado de germinación, en los
167 tratamientos 5, 8 y 10 son altos (Tabla 2), no así el índice de sincronización del proceso
168 germinativo ($Z=0$; e.g. tratamientos 5 y 8) (Tabla 2). Estos resultados son similares a lo
169 reportado en *A. ananassoides*, *Dyckia tuberosa* y *B. serra* (Anastacio & Santana, 2010; Vieira
170 *et al*, 2007; Klekalio *et al.*, 2012), los autores lo atribuyen a la dormancia que presentan las
171 semillas, lo que les permite aumentar las posibilidades del establecimiento de la especie
172 vegetal. Durante la fase de latencia, las semillas pueden mantener su viabilidad durante largos
173 periodos de tiempo, esperando las condiciones adecuadas para su desarrollo. Como una
174 estrategia que permitiría a la especie formar bancos de semillas persistentes.

175 Insertar Tabla 2

176 Es conveniente mencionar que con el incremento del tiempo de almacenamiento de las
177 semillas de *B. karatas* (6 meses), el %G disminuyó en un rango del 40-70%. Datos
178 corroborados con la prueba de viabilidad de Tetrazolio (30-60 %). La germinación está
179 relacionada con la progresiva pérdida de la capacidad de germinar (viabilidad) y el tiempo que
180 tardan en perder su viabilidad (longevidad), éstas características son específicas para cada
181 especie, y aunado a las condiciones morfológicas y fisiológicas de las semillas en el momento
182 de la siembra, así como de las condiciones ambientales del lugar de colecta (Sosa-Luría *et al.*,
183 2012). La viabilidad encontrada en *B. karatas* concuerda con los datos reportados para
184 *Bromelia pinguin* (80%, 6 meses) (Flores *et al.*, 2010).

185 Por otro lado, las plántulas de *B. karatas* de 3 meses de edad, obtenidas en cultivos *in vitro*,
186 se desarrollaron normalmente alcanzando un tamaño de 6-12 cm. Posteriormente, fueron
187 lavadas y sembradas en macetas para su aclimatización *ex vitro*, logrando un 100 % de
188 sobrevivencia a los 30 d, con un crecimiento de 1 cm en promedio (Fig. 2). Datos reportados
189 para especies de la misma familia *Hechtia myriantha* y *Tillandsia limbata*, muestran menor
190 crecimiento que *B. karatas* (0.3 mm y 0.1 mm en 24 días, respectivamente) y no lograron
191 sobrevivir *ex vitro*, después de 11 d (Elizalde, 2014). El proceso de aclimatación exitosa,
192 aunado a los altos porcentajes de germinación, puede ser empleado en un proceso de
193 propagación masiva de *B. karatas*.

194 Insertar Figura 2

195
196

CONCLUSIONES

197 Se logró establecer las condiciones asépticas para el establecimiento de cultivo *in vitro* en
198 semillas de *B. karatas* con detergente 1 %-15 min, e hipoclorito de sodio 0.6 %- 10 min. Bajo
199 este tratamiento de desinfección y con la escarificación química (H_2SO_4 , 98 %-5 min), se logró
200 el 100% de germinación, demostrando ser un tratamiento eficiente para superar la dormancia
201 tegumentaria en semillas de *B. karatas*, comenzando el proceso de germinación a los 5 d,
202 representando 36 veces menos el tiempo necesario, al compararse con datos reportados de
203 campo. Por otro lado, el protocolo de propagación a través de la semilla, fue comprobado
204 hasta la aclimatación *ex vitro* con un 100% de sobrevivencia. Éstos resultados pueden
205 aplicarse en programas de propagación, conservación y aprovechamiento sustentable de *B.*
206 *karatas*.

207

208

AGRADECIMIENTOS

209 El autor FJA-M agradece la beca para los estudios de maestría otorgada por CONACyT. Los
210 autores JO-V y LB-G agradecen el financiamiento parcial a través del proyecto CONACyT de
211 Ciencia Básica 167564.

212

213

214

215

REFERENCIAS

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

Anastácio, M. R. & Santana, G. D. (2010). Características germinativas de sementes de
Ananas ananassoides (Baker) L. B. Sm. (Bromeliaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32,195-200. doi:10.4025/actascibiolsci.v32i2.1693.

Beisiegel, B. M. & Mantovani, W. (2006) Habitat use, home range and foraging preferences
of the coati *Nasua nasua* in a pluvial tropical Atlantic forest area. *Journal of Zoology*,
269,77-87. doi/10.1111/j.1469- 7998.2006.00083.x/full.

Benzing, D. H. (2000). Bromeliaceae: Profile of an adaptive radiation. (17-176). Cambridge
University Press. Cambridge, United Kingdom 117p.

Coelho, M. F. B., Vieira, S. N., Chig, L. A., Santos, L. W., & Albuquerque, M. C. F. (2011).
Superação da dormência em sementes de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae).
Horticultura Brasileira, 29,472-476. doi:10.1590/S0102-05362011000400005.

Da Rosa, S. G. T., & Ferreira, A. G. (1998). Germinação de sementes de espécies
medicinais do Rio Grande do Sul: *Bromelia antiacantaha* Bert., *Cuphea
carthagenensis* (Jacq.) Macbride e *Talinum patens* (Jacq.) Willdenow. *Acta Botanica
Brasilica*, 12, 515-522. <http://www.scielo.br/pdf/abb/v12n3s1/v12n3s1a18.pdf>

Da Silva, A. L. L., Franco, E. T. H., Dornelles, E.B., Bortoli, C.L.R., & Quoirin, M. (2009). *In vitro*
multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). *Iheringia. Série*

232 *Botánica, Porto Alegre* 64, 151-156.
233 http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20140328112639ih64_2_p151_155.pdf

234 Dutra, A. S., Teófilo, E. M., & Medeiros, S. (2010). Germinação de sementes de macambira
235 (*Bromelia laciniosa* Mart. Ex Schult). *Caatinga*, 23,12-17.
236 <http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/article/view/1610>

237 Elizalde, C. V. (2014). Germinación de semillas y sobrevivencia de plántulas de tres
238 especies de *Tillandsia* y dos de *Hechtia*. Colegio de Postgraduados. Tesis de
239 Maestría en Ciencias. Posgrado de botánica. Campus Montecillo.

240 Flores, M., Mondragón, D. M., Ramírez, I. (2010). Conservación, caracterización, manejo y
241 aprovechamiento sustentable de las bromelias mexicanas. Resúmenes ejecutivos.
242 Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. *Sistema Nacional de*
243 *Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la Agricultura*. Estado de México,
244 México. pp. 201-203. <http://www.sinarefi.org.mx/redes/resejec10bromelias.pdf>

245 Klekailo, G. N., Tuesca, D., & Barberis, I. M. (2012). Efectos de la temperatura, el ambiente
246 lumínico y la escarificación sobre la germinación de semillas de *Bromelia serra*
247 Griseb. (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, 34, 605-612.
248 doi:10.1590/S0101-31222012000400011

249 Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., & Córdoba, F. (1990). Subunit structure of karatacin,
250 the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural and Biological*
251 *Chemistry*, 54, 17-24. doi: 10.1080/00021369.1990.10869883

252 Motta-Junior, J. C. & Martins, K. (2002). The frugivorous diet of the maned Wolf,
253 *Chrysocyon brachyurus* in Brazil: ecology and conservation. In: Levey, D. J., Silva,

254 W. R., and Galetti. M. (eds.). Seed Dispersal and Frugivory: Ecology, Evolution and
255 Conservation. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK. Pp. 291-303.

256 Moyano, D. D., Osorio, R. M., Murillo, P. E., Murillo, A. W., Solanilla, D. J., Méndez, A. J., &
257 Ariztizabal, S. J. (2012). Evaluación de parámetros bromatológicos, fitoquímicos y
258 funcionalidad antioxidante de frutos de *Bromelia karatas* (Bromeliaceae). *Vitae*, 19,
259 S439-S441. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914138>

260 Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with
261 tobacco tissue cultures. *Physiologia. Plantarum*, 15,473-497. doi:10.1111/j.1399-
262 3054.1962.tb08052

263 Orellana, A., Guerra, R., & Dávila J. A. (2004). Sondeo agrosocioeconómico y recolección
264 de cultivares de muta (*Bromelia* sp.) en el oriente de Guatemala. Bogota (Colombia):
265 ICTA, 323N MUTA 040105, 23 p.
266 http://www.icta.gob.gt/fpdf/recom_/rec_nat/%28INFORME%20SONDEO%20Y%20R
267 [ECOLECCI_323N%20MUTA%20040105%29.pdf](http://www.icta.gob.gt/fpdf/recom_/rec_nat/%28INFORME%20SONDEO%20Y%20R)

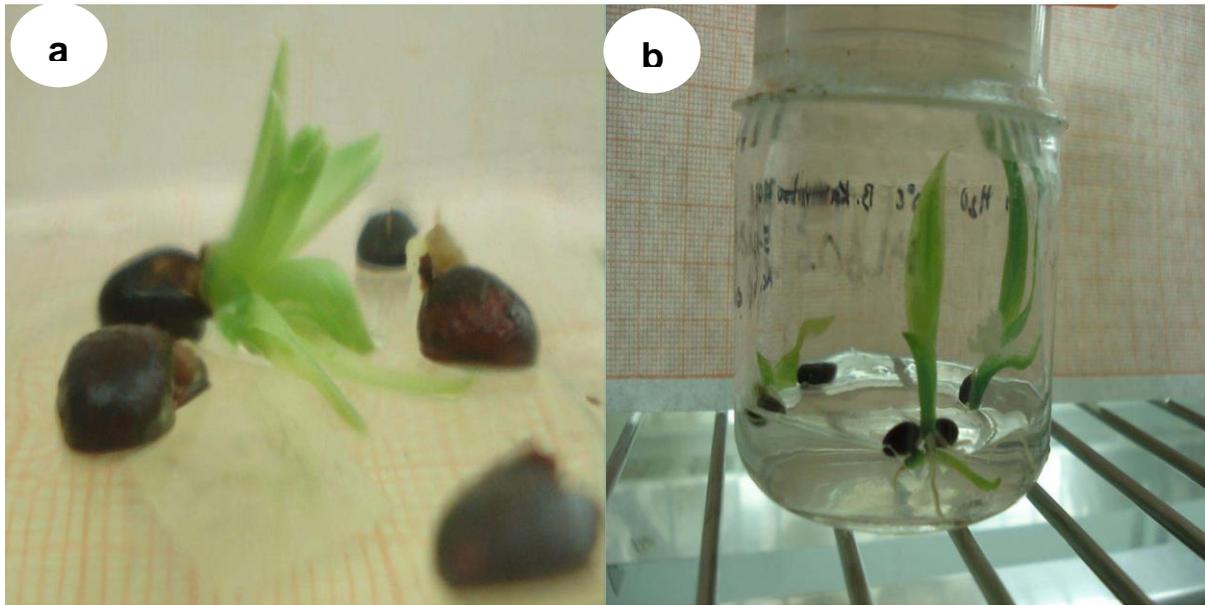
268 Pickens, K. A., Affolter, J. M., Wetzstein, H. & Wolf, J. H. D. (2006). Adventitious
269 development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In vitro Cellular & Developmental*
270 *Biology- Plant*, 42, 348–353. doi:10.1079/IVP2006779

271 Pompelli, M. F. (2006). Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides*
272 (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). *Floresta e Ambiente*, 13, 1-9.
273 <http://www.floram.org/files/v13n1/v13n1a1.pdf>

274 Sosa-Luría, D., Chávez-Servia, J. L., Mondragón-Chaparro, D., Estrada-Gómez, J. A., &
275 Ramírez-Vallejo, P. (2012). Viabilidad y germinación de semillas de seis especies de

276 *Tillandsia* (Bromeliaceae) de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35, 37-
277 42. http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/35-3_Especial_5/6a.pdf
278 Vieira, D. C. M., Socolowski, F. & Takaki, M. (2007). Germinação de sementes de *Dyckia*
279 *tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae) sob diferentes temperaturas em luz e escuro.
280 *Revista Brasileira de Botanica*. 30, 183-188. doi:10.1590/S0100-
281 84042007000200003.

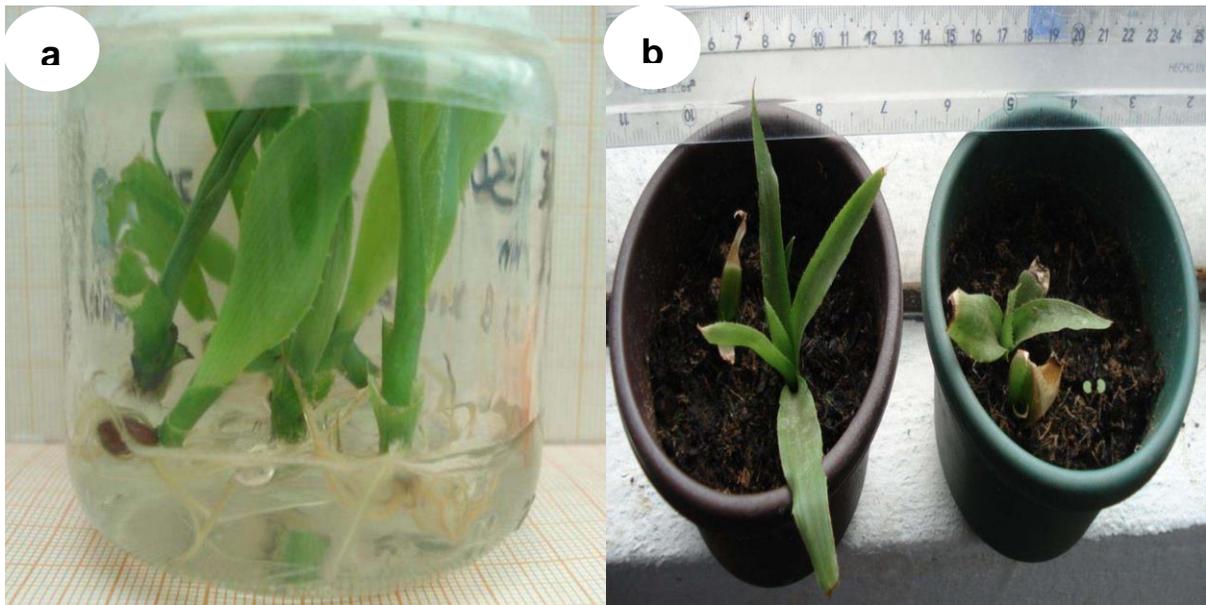
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13



14
15
16 **Fig.1 Cultivos *in vitro* de *Bromelia karatas*, (a) Semillas germinando, (b) Plántulas de 30 d de edad,**
17 **creciendo en medio MS, incubadas a 25°C y bajo un fotoperiodo de 16 h luz.**
18

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47



48
49
50
51
52
53

Fig. 2 Plántulas de *Bromelia karatas*, (a) Plántulas desarrolladas *in vitro*, a los 90 días de edad, (b) Plántulas aclimatadas *ex vitro* en peat moss-agrolita a los 30 días de su extracción de las condiciones *in vitro*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Tabla 1. Efecto de los tratamientos de escarificación evaluados, en la germinación de semillas de *B. karatas*, a los 30 días de cultivo en medio MS

Tratamiento	Escarificación	% Germinación
Control	Ninguna	0.0 ^a
1	Mecánica	0.0 ^a
2	Hídrica 20°C, 24 h	0.0 ^a
3	Térmica 30°C, 1 min	0.0 ^a
4	Térmica 30°C, 5 min	0.0 ^a
5	Térmica 100°C, 1 min	25±10 ^b
6	Térmica 100°C, 5 min	50±0 ^c
7	Química 30%, 1 min	80±20 ^d
8	Química 30%, 5 min	10±0 ^a
9	Química 98%, 1 min	70±10 ^d
10	Química 98%, 5 min	100±0 ^e

13
14
15
16
17
18
19
20
21

Los datos representan el promedio de tres réplicas ± DS. Medias en columnas, con diferente letra son significativamente diferentes ($p \leq 0.5$).

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

Tabla 2. Efectos de los tratamientos de escarificación sobre los parámetros en el proceso de germinación de *B. karatas*, bajo cultivo *in vitro*

Tratamiento	Germinación (% G)	Tiempo promedio de germinación (t)	Tasa media de germinación (v)	Índice de sincronización del proceso de germinación (Z)	Incertidumbre del proceso de germinación (U)	Coefficiente de variación en el tiempo de germinación (CVt)
Control	00.0	00.00	0.000	0.00	00.00	00.00
T5	25.0	82.00	0.012	0.00	24.00	25.36
T6	50.0	23.20	0.043	0.60	00.00	29.13
T7	80.0	72.13	0.013	0.14	00.40	26.63
T8	10.0	53.00	0.018	0.00	33.33	43.80
T9	70.0	61.17	0.016	0.20	01.22	17.17
T10	100.0	5.80	0.017	0.35	33.33	47.05

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59