



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA

**MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Tillandsia*  
*viridiflora* (Beer) Baker**

**JONATHAN MÁRQUEZ MARTÍNEZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe JONATHAN MARQUEZ MARTINEZ, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor MARIA CRSTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Morfogénesis in vitro de Tillandsia viridiflora (Beer) Baker

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 29 de Julio de 2019



Firma del  
Alumno (a)



DRA. MARIA CRSTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada “*Morfogénesis in vitro de Tillandsia viridiflora (Beer) Baker*”, realizada por el alumno: **JONATHAN MÁRQUEZ MARTÍNEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENÉTICA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERA**

---

**DRA. MARÍA CRISTINA GUADALUPE LÓPEZ PERALTA**

**ASESOR**

---

**DR. ELEODORO HERNÁNDEZ MENESES**

**ASESOR**

---

**DR. NICACIO CRUZ HUERTA**

# MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker

Jonathan Márquez Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

*Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker es una bromelia endémica de México de gran valor ornamental. Es considerada una especie amenazada por la destrucción de su hábitat y el comercio ilegal. Para aprovechar este recurso fitogenético se requieren sistemas de propagación eficientes. Una opción la ofrecen las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Los objetivos fueron: definir las mejores condiciones para la germinación *in vitro* de semillas, determinar su viabilidad, regenerar plántulas por organogénesis directa y aclimatar las plántulas. Se sembraron semillas de ocho y diez meses de edad en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con 6-bencilaminopuira (BAP) y ácido naftalenacético (ANA). Un lote de semillas de cada edad se almacenó a 10 °C durante 38 semanas. La organogénesis se indujo a partir de plántulas germinadas *in vitro* sembradas en medio MS adicionado con BAP (0.0-8.8 µM) y ANA (0.0-2.1 µM). Para el alargamiento, grupos de brotes de la etapa de multiplicación, se colocaron en medio MS con ácido giberélico (0-5.77 µM). Para el enraizamiento, se cultivaron brotes en medio MS con 50% de concentración de sales adicionado con ANA (0.00-2.15 µM), ácido indol-3-butírico (0.00-2.15 µM). En aclimatación se evaluaron plántulas enraizadas *in vitro* con dos alturas (4.5 y 6.5 cm) y dos sustratos (turba perlita (1:1) y corteza de pino). La germinación fue de 82% en ambas edades de semilla, a las cinco semanas. Las semillas se mantuvieron viables por 38 meses (germinación promedio de 78.9%). En la organogénesis la mayor cantidad de brotes (10.4) se obtuvo con 6.65 µM de BAP y 0.5 µM de ANA y la mayor cantidad de brotes multiplicados (13.0) se logró con 4.4 µM de BAP y 0.5 µM de ANA, ambos resultados a las 12 semanas. El mejor alargamiento de brotes (1.5 cm) se consiguió con 5.7 µM de ácido giberélico. El mayor número de raíces (2.4) se indujo con 1.0 µM de ANA. Durante aclimatación la supervivencia fue de 100%.

**Palabras clave:** bromelia, germinación, viabilidad, propagación *in vitro*, organogénesis

## *In vitro* MORPHOGENESIS OF *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker

Jonathan Márquez Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2019

### ABSTRACT

*Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker is a Mexican endemic bromeliad of high ornament value. It is considered an endangered species by the destruction of its habitat and illegal trade. To take advantage of this phylogenetic resource efficient propagation systems are required. One option is offered by the *in vitro* plant tissue culture techniques. The goals were: to define the best conditions for *in vitro* germination of seeds, determine their viability, regenerate plants by direct organogenesis and acclimatization of plantlets. Seeds of eight and ten months of age were planted in MS medium with 50% of salt concentration added with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthalenacetic acid (NAA). A batch of seeds of each age was stored at 10 ° C for 38 weeks. Organogenesis was induced from *in vitro* germinated seedlings seeded in MS medium added with BAP (0.0-8.8 µM) and NAA (0.0-2.1 µM). For elongation, groups of shoots grown in the multiplication stage were placed in MS medium with gibberellic acid (0-5.77 µM). For rooting, shoots were grown in MS medium with 50% of salt concentration added with NAA (0.00-2.15 µM), indole-3-butyric acid (0.00-2.15 µM). In acclimatization rooted seedlings *in vitro* were evaluated with two heights (4.5 and 6.5 cm) and two substrates (peat:perlite (1:1) and pine bark). Germination was 82% at both seed ages, at five weeks. The seeds remained viable for 38 months (average germination of 78.9%). In the organogenesis, the greatest number of shoots (10.4) was obtained with 6.65 µM of BAP and 0.5 µM of NAA and the greatest amount of multiplied shoots (13.0) was achieved with 4.4 µM of BAP and 0.5 µM of NAA, both results at 12 weeks. The best elongation of shoots (1.5 cm) was carry out with 5.7 µM of gibberellic acid. The largest number of roots (2.4) was induced with 1.0 µM of NAA. During acclimatization the survival was 100%.

**Keywords:** bromeliad, germination, viability, *in vitro* propagation, organogenesis.

## **DEDICATORIA**

No tengo palabras para expresar mi amor y mi gratitud por mi familia, por su fe, su generosidad y su incansable ayuda en todo momento, gracias a ella he llegado a culminar un peldaño más de mi vida.

A mi consejera

Dra. María Cristina Guadalupe López Peralta, quien desde el primer momento me brindó su amistad, su bondad.

A mis amigos y profesores

Por su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado, pero sobre todo por la amistad prestada.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Posgraduados por brindarme la oportunidad de cursar los estudios de posgrado, por el apoyo y facilidades prestadas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) quien me proporcionó el sustento económico para poder culminar mis estudios de postgrado.

A mis padres y mi familia quienes siempre me han brindado su apoyo.

Dra. Ma. Cristina López Peralta, muchas gracias por su asesoría, quien con paciencia encausó mi trabajo con sus conocimientos, con el firme propósito de conseguir un producto de alto nivel.

Dr. Eleodoro y Dr. Nicacio que con su amplia experiencia y conocimientos me orientaron al correcto desarrollo y culminación de este trabajo.

Mi agradecimiento a todos, mi familia, mis amigos que de una u otra manera me brindaron su colaboración y se involucraron en este proyecto.

Muchas gracias.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	5
2.1 Objetivo general.....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
2.3 Hipótesis .....	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
3.1 Generalidades de bromelias .....	6
3.1.1 Ecología.....	8
3.1.2 Taxonomía.....	8
3.1.3 Importancia económica.....	9
3.1.4 Importancia ecológica .....	10
3.2 Descripción botánica de <i>Tillandsia viridiflora</i> .....	10
3.3 Cultivo de bromelias .....	13
3.3.1 Plagas y enfermedades.....	14
3.3.2 Propagación de bromelias .....	14
3.4 Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i> .....	15
3.4.1 Totipotencia celular .....	16
3.4.2 Morfogénesis <i>in vitro</i> .....	16
3.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos <i>in vitro</i> .....	17
3.5.1 Genotipo.....	17
3.5.2 Explante.....	18
3.5.3 Medio de cultivo .....	19
3.5.4 Fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal.....	19

3.5.5 Fuente de carbono.....	20
3.5.6 Otros suplementos .....	21
3.6 Cultivo <i>in vitro</i> de bromelias.....	21
3.6.1 Medio de cultivo .....	21
3.6.2 Tipos de explantes utilizados <i>in vitro</i> .....	22
3.6.3 Establecimiento del cultivo aséptico.....	23
3.6.4 Reguladores del crecimiento .....	25
3.6.5 Aclimatación.....	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1 Material vegetal .....	28
4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación .....	29
4.3 Cultivo aséptico .....	29
4.3.1 Variables cuantificadas.....	30
4.4 Establecimiento <i>in vitro</i> .....	30
4.4.1 Variables cuantificadas.....	31
4.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico .....	32
4.4.3 Viabilidad de semillas .....	32
4.5 Regeneración de plántulas por organogénesis .....	33
4.5.1 Inducción de brotes .....	33
4.5.2 Multiplicación de brotes.....	34
4.5.3 Alargamiento de brotes .....	35
4.5.4 Enraizamiento de plántulas .....	36
4.5.5 Aclimatación de plántulas.....	37
4.6 Resumen esquemático metodológico .....	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	40
5.1 Cultivo aséptico .....	40
5.2 Establecimiento <i>in vitro</i> .....	40
5.2.1 Viabilidad de semillas .....	48
5.3 Regeneración de plántulas por organogénesis directa.....	49
5.3.1 Inducción de brotes .....	49
5.3.2 Multiplicación de brotes.....	52

5.3.3 Alargamiento de brotes .....	56
5.3.4 Enraizamiento de plántulas .....	57
5.4 Aclimatación de plántulas.....	60
5.5 Resumen esquemático de resultados .....	63
VI. CONCLUSIONES .....	64
VII. RECOMENDACIONES .....	65
VIII. LITERATURA CITADA.....	66
IX. APÉNDICE .....	81

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la germinación <i>in vitro</i> y organogénesis de <i>Tillandsia viridiflora</i> . .....	31
Cuadro 2. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la inducción de brotes de <i>Tillandsia viridiflora</i> a partir de plántulas <i>in vitro</i> . .....	33
Cuadro 3. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.5 $\mu$ M de ácido naftalenacético (ANA) evaluados en la multiplicación de brotes de <i>Tillandsia viridiflora</i> . .....	34
Cuadro 4. Concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) evaluadas en el enraizamiento de brotes <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia viridiflora</i> . .....	36
Cuadro 5. Germinación (% , desviación estándar) <i>in vitro</i> de semillas de ocho y diez meses de edad en <i>T. viridiflora</i> almacenadas a 10 °C durante 38 y 25 semanas. ....	48
Cuadro 6. Porcentaje de brotación (B) y número de brotes por explante (BE) inducidos en plántulas <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia viridiflora</i> con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro, ocho y doce semanas de cultivo. ....	50
Cuadro 7. Brotación (B, %) y número de brotes por explante (BE) inducidos en plántulas <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia viridiflora</i> con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las ocho y doce semanas de cultivo. ....	52
Cuadro 8. Longitud del brote (BE) y número de brotes (BE) obtenidos en plántulas <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia viridiflora</i> con ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ) a las ocho semanas de cultivo. ....	56
Cuadro 9. Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Tillandsia viridiflora</i> con ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) a las seis semanas de cultivo. ....	58
Cuadro 10. Aclimatación de <i>Tillandsia viridiflora</i> en plántulas de 4.5 y 6.5 cm con sustrato de turba+perlita (T+P) y corteza de pino (CP) después de 12 semanas. ....	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras anatómicas de las bromelias (Mondragón <i>et al.</i> , 2009).....	7
Figura 2. Estructuras anatómicas de <i>Tillandsia viridiflora</i> . A) aspecto general de la planta, B) inflorescencia, C) flores, D) sépalos, E) pétalos, F) androceo y gineceo, G) antena, H) estigma. Fuente: Espejo-Serna <i>et al.</i> , 2010. ....	12
Figura 3. <i>Tillandsia viridiflora</i> . (a) Ejemplar en floración; (b) cápsulas.....	28
Figura 4. Diagrama de flujo para la morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Tillandsia viridiflora</i> . ....	39
Figura 5. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Tillandsia viridiflora</i> de diez meses de edad en medio MS con 50% de concentración de sales después de 12 semanas de cultivo. ....	42
Figura 6. Estructuras nodulares similares a callos en semillas de <i>Tillandsia viridiflora</i> desarrolladas en medio MS sin reguladores de crecimiento. ....	44
Figura 7. Respuestas <i>in vitro</i> observadas en semillas de <i>Tillandsia viridiflora</i> cultivadas en medio MS con la mitad de concentración de sales y diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y Ac. Naftalenacético (ANA). a) Semillas de 10 y b) 8 meses de edad.....	45
Figura 8. Respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> observadas en semillas de <i>Tillandsia viridiflora</i> después de 16 semanas de cultivo en medio MS. a) Brotes inducidos con 0.44 $\mu\text{M}$ de BAP y 0.05 $\mu\text{M}$ de ANA, b) Plántulas anormales con 0.44 $\mu\text{M}$ de BAP y 0.20 $\mu\text{M}$ de ANA, c) Inducción de brotes con 0.22 $\mu\text{M}$ de BAP y 0.05 $\mu\text{M}$ de ANA, d) Callos con ennegrecimiento.....	46
Figura 9. Comportamiento de la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Tillandsia viridiflora</i> de ocho y diez meses de edad almacenadas a 10 °C por 38 semanas.....	48
Figura 10. Inducción de brotes a partir de plántulas de <i>Tillandsia viridiflora</i> con 6.65 $\mu\text{M}$ de BAP y 0.5 $\mu\text{M}$ de ANA después de 12 semanas de cultivo. ....	51
Figura 11. Multiplicación de brotes de <i>Tillandsia viridiflora</i> con a) 4.43 $\mu\text{M}$ de BAP, b) 3.32 $\mu\text{M}$ de BAP, c) 5.54 $\mu\text{M}$ de BAP y d) 2.21 $\mu\text{M}$ de BAP combinadas con 0.5 $\mu\text{M}$ de ANA después de 12 semanas de cultivo. ....	54

Figura 12. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Tillandsia viridiflora* con 1.0  $\mu$ M de ANA después de seis semanas de cultivo.....58

Figura 13. a) Aclimatación de plántulas de *Tillandsia viridiflora* después de una semana. Plantulas de 6.5 cm de altura con: b) sustrato de corteza de pino c) y d) con sustrato de turba+perlita (1:1) después de 12 semanas. ....62

Figura 14. Diagrama de flujo de resultados de la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora*. ....63

## I. INTRODUCCIÓN

Se ha reconocido a nivel mundial la belleza de las plantas epífitas, y un gran número han sido adoptadas como plantas de ornato; sin embargo, es desconocido su manejo y técnicas eficientes de producción que permitan satisfacer el mercado local. Este problema ha ocasionado que las plantas sean extraídas de su ambiente natural sin control (Vazquez, 2014).

La flora de México presenta gran diversidad de especies con valores estéticos que requieren el estudio constante de exploración y conocimiento. Parte de esta diversidad son las bromeliáceas cuyas inflorescencias elegantes, frutos, follaje, variedad de tamaños y morfología se han convertido en plantas ornamentales ideales para decorar espacios interiores y exteriores (Miranda *et al.*, 2007). Dentro de sus atributos importantes destacan la tolerancia a factores ambientales así como a plagas y enfermedades (Mondragón *et al.*, 2011). También pueden cultivarse si se les brinda el manejo apropiado (Franca y Araujo, 2013; Vázquez *et al.*, 2014). En festividades religiosas y en navidad las bromelias se han convertido en un elemento importante de decoración (Méndez *et al.*, 2011).

Las bromelias desempeñan un papel ecológico importante (Mondragón *et al.*, 2011) ya que son el hábitat de insectos, ranas y lagartijas, también, son fuente de alimentos para aves y murciélagos. Estas plantas pueden ser abundantes en los bosques y representar hasta 50% de las especies de la vegetación (Toledo, 2014). En el mundo existen aproximadamente 60 géneros de bromelias que incluyen 3,170 especies (Sheu *et al.*, 2017), de las cuales 356 (11.2 %) se encuentran en México y de éstas 233 (7.3 %) son endémicas de México (CONABIO, 2012). Estas plantas presentan condiciones evolutivas bastante desarrolladas que les permiten absorber del aire la humedad necesaria para vivir y resistir largos períodos de sequía.

Los generos más sobresalientes de las bromelias son *Vriesea Lindl.*, *Neoregelia L. B. Sm.*, *Guzmania Ruiz & Pav.*, *Billbergia Thunb.*, *Aechmea Ruiz & Pav.* y *Tillandsia L.* El género más grande de la familia bromeliaceae es *Tillandsia L* y agrupa 21.2 % del total de especies de las cuales el 94.6 % son epifitas (Zotz, 2013). Cerca de 22 especies de *Tillandsia* son utilizadas como fibras, forrajes, combustible, medicinal y ornamentales (Méndez *et al.*, 2011). Además, se ha documentado que la mayoría (90.4%) de las bromelias que se comercializan en mercados de Oaxaca pertenecen a este género (Mondragón, 2008).

La familia bromeliaceae en México se caracteriza por presentar un alto grado de endemismo. La NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye a 21 especies de bromelias como amenazadas y/o protegidas de las cuales 17 corresponden al género *Tillandsia*. Sin embargo, es altamente probable que toda la familia sea vulnerable por los habitats específicos que requieren para sobrevivir.

Como se mencionó anteriormente, se han estudiado aspectos ecológicos en bromelias pero esta información no se ha vinculado con otros trabajos que definan técnicas eficientes de propagación y su manejo agronómico como cultivo ornamental. Estos estudios son indispensables para aprovechar las especies con fines comerciales y evitar el saqueo de su ambiente natural (Lavor *et al.*, 2014). Si bien, en México hay Unidades de Manejo Ambiental que funcionan como viveros de bromelias aún se carece de información básica sobre la reproducción. Las semillas de algunas especies requieren condiciones específicas de humedad, temperatura y sustrato para germinar, como es el caso de las especies del género *Vriesea* que producen semillas con baja capacidad de germinación (Vázquez *et al.*, 2014).

Las bromelias que se comercializan en México son extraídas de los bosques de forma ilegal y desmedida, con el fin de ser utilizadas como fibras, alimento, follaje, medicina, ornamental y ceremonial. Así mismo, la destrucción de estos ambientes naturales, colocan a las bromelias no sólo como especies vulnerables sino también en peligro de extinción (Mondragón, 2008; Méndez *et al.*, 2011; Pech *et al.*, 2012).

*Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker es una bromelia epífita de hojas verdes con inflorescencias erectas y flores blancas. Es nativa de México, Guatemala, Honduras y Nicaragua (Espejo-Sernal *et al.*, 2010). Aunque no es una especie incluida en la NOM-059-SEMARNAT-2010, es una bromelia que se considera amenazada, en algunas regiones, y en peligro de extinción en otras a causa de la destrucción de su hábitat y comercio ilegal. La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas cataloga a la especie con un índice de 3, que corresponde a aquellas especies que si bien en la actualidad no se encuentran en peligro de extinción, podrían llegar a estarlo en un corto plazo (CONAP, 2010). Al igual que para la mayoría de especies de bromelias de México, *T. viridiflora* es un recurso fitogenético que se aprovecha de forma silvestre. No existen estudios de domesticación ni de cultivo de la especie y su comercio como planta ornamental se basa en la extracción de los bosques de ejemplares adultos próximos a la floración. Esta forma ilegal de aprovechamiento reduce drásticamente las poblaciones naturales.

En México existen muy pocos viveros dedicados a la producción intensiva de bromelias. La propagación se puede llevar a cabo, mediante propagación sexual, que toma varios años para obtener una planta adulta porque la tasa de crecimiento es lenta, o propagación asexual por medio de la formación de brotes vegetativos a partir de una planta madre (Vazquez, 2014).

Actualmente no se tienen referencias sobre la propagación convencional o *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* que proporcione información sobre su multiplicación masiva; es por ello que, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrecen una alternativa de propagación *in vitro* al ser un conjunto heterogéneo de técnicas que permiten la regeneración de plantas a partir de explantes, incluidas las semillas. Estas técnicas junto con nuevos desarrollos biotecnológicos han contribuido a la propagación, rescate y conservación de especies vegetales vulnerables o en peligro de extinción entre otras (Anis y Ahmad, 2016).

Con la finalidad de generar información básica para el rescate, conservación y aprovechamiento comercial de *Tillandsia viridiflora* la presente investigación se planteó como objetivos determinar las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de *Tillandsia viridiflora*, evaluar su viabilidad y regenerar plantas por organogénesis a partir de plántulas germinadas *in vitro*.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Establecer la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* a partir de la germinación de semillas y regeneración de plántulas por organogénesis.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un procedimiento óptimo de desinfección de semillas para el cultivo aséptico de *T. viridiflora*.
- Definir las condiciones óptimas de medio de cultivo y reguladores del crecimiento para la germinación *in vitro* de *T. viridiflora*.
- Determinar la viabilidad de semillas de *T. viridiflora*
- Determinar las condiciones óptimas de medio de cultivo y reguladores del crecimiento de *T. viridiflora* óptimos para la inducción, multiplicación, alargamiento y enraizamiento de brotes vía organogénesis.
- Establecer las mejores condiciones para la aclimatación de plántulas de *T. viridiflora* obtenidas *in vitro*.

### 2.3 Hipótesis

- El establecimiento del cultivo aséptico de semillas de *T. viridiflora* está determinado por el tipo y concentración de agente desinfectante empleado así como de los tiempos de inmersión.
- La mejor germinación *in vitro* de *T. viridiflora* depende de la viabilidad de la semilla.
- Las respuestas morfogénicas de *T. viridiflora* dependen del tipo de explante y de las combinaciones de reguladores del crecimiento empleadas en cada etapa de la ruta morfogénica.
- Es posible aclimatar plántulas propagadas *in vitro* de *T. viridiflora*.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

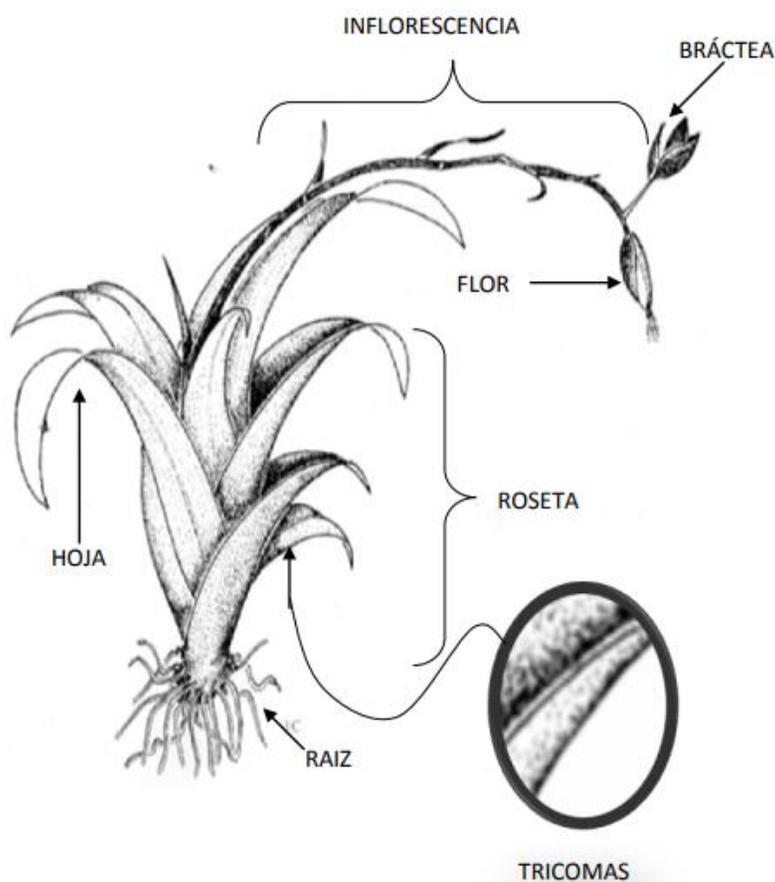
#### 3.1 Generalidades de bromelias

Las bromelias crecen en diferentes hábitats y tienen características fisiológicas que les permiten conquistar ambientes altamente restrictivos (Mondragón *et al.*, 2011). Las plantas crecen como rupícolas, terrestres y epífitas (Vieira *et al.*, 2014). Las plantas epífitas se sujetan al árbol para obtener un soporte, de esta forma, pueden alcanzar la mayor cantidad de luz, humedad, materia orgánica y nutrientes para su desarrollo (Martínez-Meléndez *et al.*, 2011).

La vía fotosintética de la mayoría de las epífitas y de algunas bromelias es el metabolismo ácido de las crasuláceas (Matiz *et al.*, 2013). La principal característica morfológica de estas plantas es la distribución de las hojas en forma de roseta (tanque) es una estructura eficiente para la incautación de agua y materia orgánica (Toledo, 2014; Brandt *et al.*, 2017). La evolución en las bromelias ha modificado las funciones de absorción de agua y nutrientes de las raíces, ha favorecido la especialización de tricomas peltados que cumplen esa función en las hojas. Las hojas de las bromelias varían considerablemente en tamaño, forma y densidad, además, están insertadas por la base en el tallo. Se distinguen tres tipos de hojas (Males, 2016).

- 1) Triangulares: Cuando presentan una base amplia y algo redondeada, que se reduce drásticamente y se vuelve casi linear a medida que se avanza hacia el ápice.
- 2) Liguladas: Cuando su forma y ancho son uniformes a lo largo de la extensión de la hoja similar a una faja o tira.

3) Lineales: Cuando las hojas son angostas y de forma lineal (Chicaiza, 2012). La Inflorescencia en general es vistosa por la presencia de brácteas coloridas. Estas pueden ser terminales, en forma de espigas, racimos o panículas, o estar ubicadas en las axilas de hojas fuertemente coloreadas (Wanderley y Martins, 2007; UNNE, 2010) (Figura 1).



**Figura 1. Estructuras anatómicas de las bromelias (Mondragón *et al.*, 2009).**

Las semillas pueden tener apéndices o estar desprovista de éstos. En la subfamilia *Pitcairnioideae* producen semillas provistas de un apéndice plumoso, en *Tillandsioideae* las semillas son aladas o bicaudadas y las semillas de *Bromelioideae* están desnudas, además, los frutos pueden ser bayas o cápsulas (Chicaiza, 2012).

### **3.1.1 Ecología**

La distribución de las plantas epífitas depende de las condiciones climáticas. Las epífitas y hemiepífitas representan el 10% de la diversidad vegetal en el mundo (Ceja *et al.*, 2008). Además, poseen un papel característico dentro del ciclo de los nutrientes y del agua, al caer al suelo del bosque se descomponen e integran a la materia orgánica (Toledo, 2014).

En el caso de las bromelias, su morfología en roseta permite establecer relaciones con algunos animales tales como insectos, ranas y reptiles (Miranda *et al.*, 2007). Se ha reportado que los ratones consumen el polen de *T. viridiflora* (Orozco-Ibarrola *et al.*, 2015). También, presentan antesis nocturna, lo cual sugiere que podrían ser polinizadas por murciélagos (Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2014).

### **3.1.2 Taxonomía**

En el mundo existen aproximadamente 60 géneros que incluyen a 3,170 especies (Sheu *et al.*, 2017). En México se tienen registradas 356 especies de las cuáles 233 son endémicas (CONABIO, 2012). La clasificación taxonómica de la familia *Bromeliaceae* es la siguiente (The Angiosperm Phylogeny Group *et al.*, 2016).

Reino: *Plantae*

Clado: *angiosperms*

Clado: *monocotiledóneas*

Clado: *commelinids*

Orden: Poales

Familia: *Bromeliaceae*

Esta familia se divide tres subfamilias clásicas, solo Bromelioideae y Tillandsioideae se consideran monofiléticas, mientras que Pitcairnioideae se subdividió en cinco nuevas subfamilias: Pitcairnioideae, Puyoideae, Navioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae y Brocchinioideae (Chicaiza, 2012; Matiz *et al.*, 2013).

El género más diverso es *Tillandsia* L. el cual representa el 21.2 % en la familia bromeliaceae con 671 especies (Zotz, 2013). Además, son de gran valor económico debido a la variedad de formas, colores en hojas y flores, que permiten usarse como plantas ornamentales o para otro propósito, ya sea, fibras, bebida, medicina, entre otras. De modo, que solo unas pocas son cultivadas para su comercio (Méndez *et al.*, 2011; Pech *et al.*, 2012).

### **3.1.3 Importancia económica**

Las bromelias se consideran novedades dentro de la industria ornamental y cada vez se observan con mayor frecuencia en jardines de lujo en todo el mundo (Negrelle *et al.*, 2012). A pesar de esto, solo dos especies de bromelias se producen de forma comercial en México; la primera es la piña (*Ananas comosus*) y la segunda es la pita (*Aechmea magdalenae*). Dentro de las bromelias ornamentales es posible observar el comercio de *Tillandsia usneoides*, *Tillandsia carlos-hankii* y *Tillandsia imperialis* (Ramírez, 2010; Molina-Luna *et al.*, 2015; SNITT, 2016).

Sin embargo, se desconoce si las plantas se producen en viveros o unidades de manejo ambiental autorizados por SEMARNAT, aunque, lo más probable es que sean ejemplares extraídos de su hábitat natural.

La bromelina es una enzima producida por *Ananas comosus* cuya función es actuar como mecanismo de defensa contra larvas de insectos, sin embargo, es de gran importancia para la industria química y farmacéutica. La hemisfericina también es producida por las Bromelias (Negrelle *et al.*, 2012). Además, por ser especies de clima tropical y comercializadas en regiones de climas templado o fríos se consideran plantas ornamentales exóticas (Miranda *et al.*, 2007).

#### **3.1.4 Importancia ecológica**

Las bromelias representan del 30 al 50 % de las especies en los bosques, además, cumplen con diversas funciones ecológicas (CONABIO, 2013; Toledo, 2014). La más importante es la relación directa con otros organismos tales como insectos, arácnidos, crustáceos, ranas, pequeñas serpientes y aves. También sirven como alimento para algunos mamíferos (Mondragón *et al.*, 2011; Pech *et al.*, 2012; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2014; Orozco-Ibarrola *et al.*, 2015).

#### **3.2 Descripción botánica de *Tillandsia viridiflora***

Es una planta nativa de México, se identifica como *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker, J. Bot. 26: 81. 1888. *Platystachys viridiflora* Beer, Fam. Bromel. p. 81. 1856 “1857”. Tipo: México, sin localidad precisa. También se conoce como lirio.

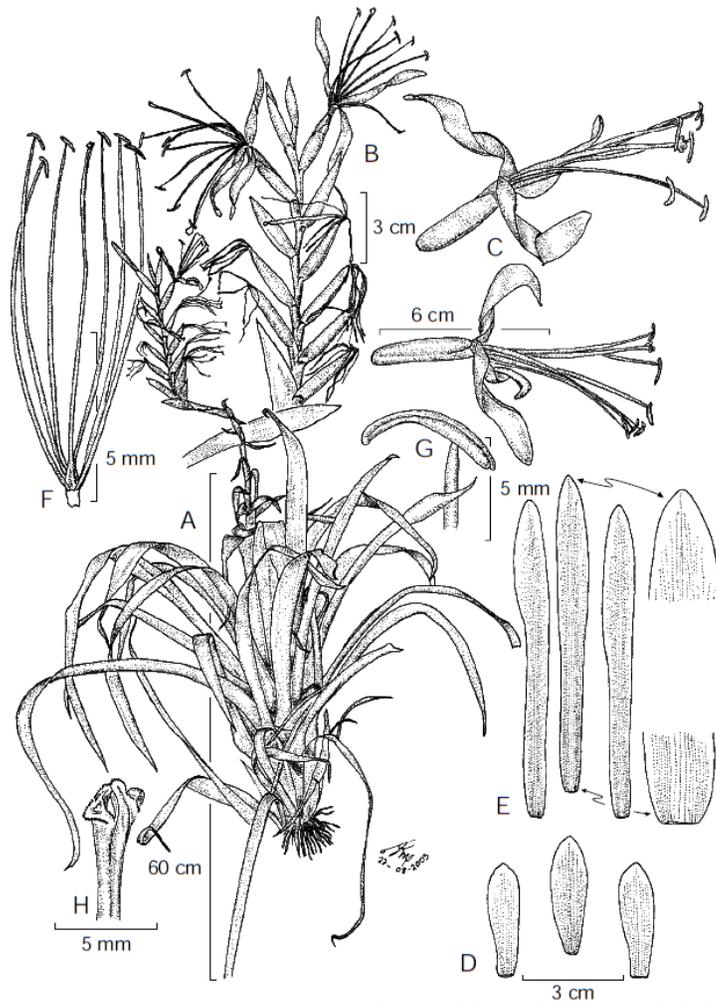
Es una especie que habita en bosques de pino-encino, bosques de encino, bosques tropicales subcaducifolios y bosques mesófilos de montaña. Se encuentra en altitudes de 1,000 a 1,800 m y su periodo de floración es de julio a diciembre. La bromelia *T. viridiflora* es una especie rara, muy escasa y se distribuye en los estados de Hidalgo, Querétaro, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas. (Espejo-Serna *et al.*, 2010).

Es una planta epífita arrosetada y acaulescente, su inflorescencia alcanza de 0.65 a 1.0 m de altura, es una bromelia tipo tanque con un diámetro de hasta 40 cm, generalmente solitarias. Las hojas son numerosas, las vainas presentan coloración pardo claras a pardo doradas con forma elíptica a oblonga, y con dimensiones de 10 a 14 cm de largo y de 5.5 a 6.5 cm de ancho. Las láminas son verdes, algo glaucas, más oscuras en el haz, cintiformes a largamente triangulares, de 25 a 50 cm de largo, de 3 a 4 cm de ancho en la base (Figura 2).

La inflorescencia terminal es erecta y simple. El pedúnculo es cilíndrico, robusto, de 45 a 50 cm de largo y de 5 a 7 mm de diámetro, cubierto totalmente por las vainas de las brácteas. Las brácteas del pedúnculo basales son foliáceas, las distales vaginiformes, las vainas son de 3.5 a 4.5 cm de largo, las láminas son de 1 a 30 cm de largo, las espigas aplanadas, de oblongas a lanceoladas, con dimensiones de 17 a 30 cm de largo y de 6 a 7 cm de ancho.

Las brácteas florales son verdes, glaucas, ampliamente elípticas, de 3.2 a 4 cm de largo, de 2 a 2.4 cm de ancho, están laxamente imbricadas, pero dejan ver el raquis en la antesis, se encuentran de lisas a nervadas, ecarinadas, redondeadas en el ápice, glabras por fuera, esparcidamente pardo-punctulado-lepidotas por dentro, flores dísticas, ascendentes, de 13 a 22 por espiga, actinomorfas, helicoiformes, subsésiles.

Los sépalos son verdes, oblanceolados, de 3 a 3.4 cm de largo y aproximadamente de 1 cm de ancho, se encuentran nervados, ecarinados, erosos y algo hialinos en el margen, agudos en el ápice, glabros por fuera, esparcidamente pardo-punctulado lepidotos por dentro. Los pétalos están libres son de color verde claros, angostamente oblongos, cintiformes, de aproximadamente 9 cm de largo y 1 cm de ancho, retorcidos, redondeados a agudos en el ápice.



**Figura 2. Estructuras anatómicas de *Tillandsia viridiflora*. A) aspecto general de la planta, B) inflorescencia, C) flores, D) sépalos, E) pétalos, F) androceo y gineceo, G) antena, H) estigma. Fuente: Espejo-Serna *et al.*, 2010.**

Los estambres son subiguales y más largos que los pétalos, los filamentos libres, verdes claros a blancos, filiformes, de 10 a 10.5 cm de largo. Las anteras presentan una coloración de verdes a verdes blanquecinas, lineares, curvadas, de 9 a 11 mm de largo, ovario verde, ovoide, y con dimensiones aproximadas de 14 mm de largo y 5 mm de diámetro. El estilo es verde, filiforme, de 10 a 11 cm de largo, el estigma es verde; cápsulas son verdes, fusiformes, rostradas, de 5.7 a 6 cm de largo, aproximadamente de 9 mm de diámetro; semillas pardas oscuras, fusiformes, de 4 mm de largo, con un apéndice plumoso blanquecino de 2.2 a 2.8 cm de largo.

### **3.3 Cultivo de bromelias**

El crecimiento de las bromelias es afectado principalmente por nutrientes, luz, sustrato y agua (FWCBS, 2016). Para nutrirlas se recomienda usar algún fertilizante a la mitad de la concentración recomendada por el fabricante o menos, de preferencia que contenga de 0.8 a 1 mS/cm. Al igual, se puede llevar a cabo una fertilización foliar en verano con concentraciones diluidas y un pH de 5.2 a 6.2 (Ruus y Pertuit, 2001; Anthura y Bureau IMAC, 2007).

En términos generales, estas plantas pueden ser cultivadas bajo una intensidad lumínica de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , aunque, cada género tiene sus propios requerimientos (OSRAM, 2016). También, se considera óptimo el rango de temperatura entre 18 y 20 °C (Anthura y Bureau IMAC, 2007).

Con respecto al sustrato, existen varias mezclas que incluyen corteza, turba y perlita esta combinación debe ser suficientemente porosa para que permita un drenaje y aireación adecuado, a la vez, tiene que retener un 25 % de agua (Ruus y Pertuit, 2001; (Anthura y Bureau IMAC, 2007).

El tamaño de las macetas dependerá del tamaño de la planta. La demanda de agua es diferente entre una bromelia tanque y una aérea, se recomienda un sistema de aspersión capacitado para suministrar entre 5 y 12 litros por m<sup>2</sup>. Se debe tomar en cuenta que las bromelias son propensas a pudrición de raíz por exceso de agua (Ruus y Pertuit, 2001; Anthura y Bureau IMAC, 2007; FWCBS, 2016).

### **3.3.1 Plagas y enfermedades**

Las bromelias son tolerantes a enfermedades y plagas, cuando se presentan, se debe a prácticas culturales inadecuadas, tales como, exceso de riego, concentración inadecuada de la solución nutritiva o la falta de sombreado (FWCBS, 2016). Entre los principales problemas es la aparición de *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, roya entre otras. El síntoma de la presencia de estos hongos se localiza tanto en la base de la planta como en las hojas. Las hojas se vuelven marrón y se pudre la planta de adentro hacia afuera (Escobar, 2001).

### **3.3.2 Propagación de bromelias**

Las bromelias en su estado natural están sujetas a sustratos inestables con baja humedad, pocos nutrientes y también están expuestas a cambios bruscos de temperatura y a altas velocidades del viento. Estas condiciones favorecen el desarrollo de ciertas adaptaciones como la producción de semillas y la formación de hijuelos. En general, gran cantidad de plantas epífitas cuentan con dos vías naturales para multiplicarse: la sexual, por las semillas, y la asexual, por los hijuelos o vástagos (Miranda *et al.*, 2007).

### **3.3.2.1 Propagación sexual**

La reproducción sexual es común en las especies de la subfamilia *Tillandsioideae* donde las semillas pueden germinar en su propia planta madre o dispersarse a grandes distancias por el viento (Alsina *et al.*, 2006). La reproducción sexual es el método más eficaz para la propagación ya que las inflorescencias normalmente producen gran cantidad de semillas por fruto (cápsula) (Escobedo, 2012). Se ha estimado que tan solo una cápsula puede producir entre 100 y 150 plántulas, dependiendo de la especie, sin embargo, mediante este proceso toma varios años obtener una planta adulta porque la tasa de crecimiento es lenta (Vázquez *et al.*, 2014).

### **3.3.2.2 Propagación asexual**

La propagación asexual de las bromelias implica la formación de brotes vegetativos a partir de una planta madre, para su supervivencia éstos se pueden originar en el rizoma, en la base de la planta o en la misma roseta. Pueden aparecer antes o durante el periodo de floración con hasta ocho individuos (Alsina *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2007). La principal ventaja de este tipo de propagación es la perpetuación de la planta, se recomienda para especies raras, plantas que no provienen de semillas autógamias como es el caso de las hibridaciones y plantas que no producen semillas (Reyes, 2015).

## **3.4 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro***

El término *in vitro* es el cultivo dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial con dos peculiaridades: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento (Cedres y Sharry, 2015). El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un conjunto de técnicas donde se aísla asépticamente un explante y se cultiva en condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Osuna y Saucedo, 2010).

Estas técnicas permiten obtener una gran cantidad de plántulas a partir de un explante, además, las plantas obtenidas son genéticamente idénticas a la planta madre (clones) (Rangel-Estrada *et al.*, 2016).

#### **3.4.1 Totipotencia celular**

La totipotencia celular es la capacidad de producir todos los tipos de células y organizarlas en un plan corporal coherente, y es la característica definitoria de un organismo (Condic, 2014). Esta teoría enunciada por Haberlandt en 1902 sostiene la posibilidad de obtener una planta completa a partir de cualquier célula viva, bajo condiciones controladas de cultivo (Cedres y Sharry, 2015). En este sentido, la totipotencia de las células vegetales permite inducir la formación de estructuras y órganos de *novo* (Villarreal, 2015).

#### **3.4.2 Morfogénesis *in vitro***

La morfogénesis se refiere a las alteraciones morfológicas de un organismo que suceden como resultado de cambios estructurales o de organización durante su desarrollo (Villarreal, 2015). Esta respuesta se manifiesta en dos rutas; la organogénesis y la embriogénesis (Ziv y Chen, 2008). Por lo cual, el crecimiento celular organizado contribuye a la formación de nuevas estructuras definidas (George, 2008). Entonces, la morfogénesis *in vitro* consiste en la obtención de órganos o embriones a partir de un explante empleando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

### **3.4.2.1 Organogénesis *in vitro***

La organogénesis *in vitro* es una de las dos vías morfogénicas para la regeneración de plántulas. El proceso consiste en la iniciación y desarrollo de nuevos órganos a partir del cultivo de células o tejidos (Villarreal, 2015). Tales órganos recién originados son estructuras unipolares y su tejido vascular está físicamente conectado al tejido de origen (Olmos *et al.*, 2010).

Este proceso puede llevarse a cabo de forma indirecta o directa; la primera se genera a partir de un callo, el cual, es una masa amorfa que pierde su arreglo parenquimático y continúa la proliferación celular del explante. La directa se origina por la formación de brotes a partir de los explantes sin que se presente la formación de callo. Además, las plantas contienen grupos de células que eventualmente dan origen a la formación de brotes adventicios (Iliev *et al.*, 2010; Olmos *et al.*, 2010).

### **3.4.2.2 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones similares a un embrión cigótico pero que se originan de células somáticas y que al germinar dan origen a individuos completos (Olmos *et al.*, 2010; Villarreal, 2015). De igual forma, la embriogénesis somática se puede establecer de forma indirecta, donde el explante primero forma un callo, o directa, donde los embriones se forman directamente del explante (Nolan y Rose, 2010).

## **3.5 Factores que afectan los procesos morfogénicos *in vitro***

### **3.5.1 Genotipo**

En cualquier género, las plantas tienen diferencias entre genotipos, cultivares o especies que afectan su respuesta morfogénica en el cultivo de tejidos desde el establecimiento, capacidad de diferenciación y crecimiento de nuevos órganos (Naranjo *et al.*, 2015; Scalzo *et al.*, 2016).

Algunos genotipos no responden al cultivo *in vitro* o son recalcitrantes, mientras que otros, responden para producir callos o brotes con facilidad (Mahmood y Razzaq, 2017). Además, la aportación relativa supone 60 % para el genotipo (Domínguez-Perales *et al.*, 2016).

### **3.5.2 Explante**

El explante es un fragmento de tejido vegetal con dimensiones aproximadas a 1 cm<sup>2</sup> el cual se establece en el medio de cultivo. El explante es uno de los factores clave para el éxito del cultivo *in vitro*; se debe tomar en cuenta la edad fisiológica u ontogénica del órgano, la época del año en la que se obtiene el explante, el tamaño y ubicación del explante, la calidad de la planta de origen, el objetivo final de la investigación y el tipo de planta (Iliev, 2010; Teixeira da Silva y Tanaka, 2010; Smith, 2013).

El tejido fisiológicamente joven es más receptivo a la adaptación *in vitro* y es más fácil para desinfectarlo superficialmente. En contraste, el tejido de mayor edad no tendrá capacidad morfogénica para la regeneración (García *et al.*, 2015; Fernández da Silva *et al.*, 2016). Con respecto al tamaño del explante se ha reportado que presenta efecto en la respuesta del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Smith, 2013). Así que, en cuanto más pequeño sea el explante, más difícil será cultivarlo. Por el contrario, entre más grande, es probable que contenga más reservas de nutrientes y reguladores de crecimiento para mantenerse en el cultivo (Mroginski *et al.*, 2010).

Cualquier parte del tejido de la planta puede usarse como un explante (Smith, 2013). Si la propagación clonal es el objetivo, entonces el explante usualmente será una yema, brote lateral o terminal (Solís *et al.*, 2011; Cancino-Escalante *et al.*, 2015).

Para la inducción de callo, generalmente se usan segmentos de cotiledón, hipocótilo, tallo, hoja o embrión cigótico (Rodríguez *et al.*, 2014; Vacca *et al.*, 2014; Teshome y Feyissa, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015). El tejido foliar de una semilla asépticamente germinada es una buena fuente de tejido para el aislamiento de protoplastos (Criollo *et al.*, 2016). Para producir plantas haploides, se cultiva la antera o el polen (Corazza *et al.*, 2016).

### **3.5.3 Medio de cultivo**

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan microorganismos, células, tejidos vegetales y animales (Boeri, 2015). De acuerdo con Gamborg y Wetter (1975), el éxito en cultivo de tejidos depende de la selección del medio, incluyendo su composición química y su forma física. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea y Tirado, 2011).

Los medios más empleados para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son: medio White (White, 1963); medio LS (Linsmaier y Skoog, 1965); medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968); medio NN (Nitsch y Nitsch, 1969); medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

### **3.5.4 Fitohormonas y reguladores de crecimiento vegetal**

Las hormonas vegetales o fitohormonas se definen como sustancias orgánicas producidas de forma natural, son activas en bajas concentraciones y afectan los procesos fisiológicos de las plantas en una posición distante de su lugar de síntesis (Sharma y Jain, 2016).

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se emplean reguladores del crecimiento que se elaboran de forma sintética y actúan de forma similar a las fitohormonas. El tipo y concentración de los reguladores del crecimiento a usar depende del propósito de la investigación a desarrollar (Smith, 2013).

Dentro de los reguladores se pueden enlistar las citocininas: (6-bencilaminopurina [BAP], cinetina [CIN], zeatina [ZEA], isopentenil-adenina [2ip], thidiazurón [TDZ]); auxinas: (ácido naftalenacético [ANA], ácido 2,4 diclorofenoxiacético [2, 4-D], ácido indolacético [AIA], ácido indol-3-butírico [AIB], ácido naftoxiacético [NOA], Dicamba, Picloram); giberelinas [AG<sub>3</sub>]; etileno y ácido abscísico [ABA] (Mroginski *et al.*, 2010; Boeri, 2015). El crecimiento y la morfogénesis *in vitro* se encuentran regulados por la interacción y el equilibrio entre ellos (Kumar y Reddy, 2011).

### **3.5.5 Fuente de carbono**

Las fuentes de carbono influyen en la morfogénesis *in vitro* (Yaseen *et al.*, 2013). Normalmente se usa la sacarosa en un rango de concentración de 2 a 5% y tiene efectos directos en el crecimiento y enraizamiento en las plantas (Saad y Elshahed, 2012). Al incrementar las concentraciones de sacarosa se producen efectos negativos en los procesos rizogénicos y se induce mayor crecimiento del explante, por el contrario, la disminución acelera el desarrollo radicular y reduce el crecimiento apical a causa de variaciones en el potencial osmótico que limita la entrada de nutrientes a la planta (Flores *et al.*, 2015). También se pueden usar otras fuentes de carbohidratos en función de los objetivos de estudio, tales como: lactosa, galactosa, maltosa y almidón; menos eficaces que la sacarosa resultan la glucosa y la fructosa (Boeri, 2015).

### 3.5.6 Otros suplementos

Las vitaminas tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas (Cruz, 2012). Además, en el medio de cultivo son necesarias porque los tejidos cultivados no tienen la capacidad de sintetizarlas (Nolan y Rose, 2010). La tiamina y el mio-inositol son las vitaminas más importantes en los medios de cultivo (Mroginski *et al.*, 2010). También se pueden añadir otras vitaminas tales como ácido nicotínico; B3, piridoxina; B6, biotina; H, entre otras, porque pueden potencializar la respuesta morfogénica (Boeri, 2015).

### 3.6 Cultivo *in vitro* de bromelias

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ha contribuido en gran medida al rescate, conservación, reintroducción de ejemplares y aprovechamiento sostenible de especies de bromelias.

#### 3.6.1 Medio de cultivo

El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) por su alta concentración de sales y equilibrio iónico lo hace una mezcla óptima para que en una gran cantidad de especies sea utilizado, por lo que, se ha considerado como un medio de cultivo universal. Se han reportado varias investigaciones donde se ha utilizado el medio MS, algunos ejemplos son: para la conservación *in vitro* se sembraron semillas de *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra en el medio MS con macronutrientes reducidos a la mitad de la concentración de sales, suplementado con 2% de sacarosa, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL y 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Pedroso *et al.*, 2010). Sin embargo, para la multiplicación de la bromelia *Vriesea reitzii* se sembraron semillas en el medio MS adicionado con vitaminas de Morel y Wetmore (1951) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (Dal Vesco *et al.*, 2014). También se ha empleado el medio MS en forma líquida en semillas de *Neoregelia concéntrica* (Rodrigues *et al.*, 2013).

Por otro lado, con la finalidad de propagar a *Billbergia zebrina* se sembraron semillas en diferentes concentraciones de sales (0%, 50%, 100%, 150% y 200%) y sacarosa (0, 15, 30, 45 y 60 g) en el medio MS (Rodrigues *et al.*, 2015). Asimismo, se han hecho modificaciones en los niveles de nitrógeno (50% y 35%) del medio MS en semillas de *Vriesea incurvata* para acelerar su desarrollo (Sasamori *et al.*, 2016). Cabe mencionar que para propagación de *Tillandsia eizii* se ha utilizado el medio de Knudson (Knudson, 1946) adicionado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 5 mg L<sup>-1</sup> ácido nicotínico, 5 mg L<sup>-1</sup> de HCl-tiamina, 4 mg L<sup>-1</sup> de glicina y 5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina (Pickens *et al.*, 2003).

### 3.6.2 Tipos de explantes utilizados *in vitro*

En especies silvestres de bromelias la semilla ha sido el mejor explante para estudios de morfogénesis y propagación *in vitro*, así en *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra se emplearon semillas para su conservación y se observó una tasa de supervivencia del 100% en la aclimatación (Pedroso *et al.*, 2010). En *Tillandsia gardneri* se utilizaron tanto semillas como plántulas germinadas *ex vitro* para evaluar el establecimiento *in vitro* (Pinto *et al.*, 2012).

En *Neoregelia concéntrica*, las semillas se germinaron *in vitro* y las plántulas procedentes de estas, se utilizaron para la etapa de multiplicación (Rodrigues *et al.*, 2013). En *Vriesea reitzii* en las semillas se indujeron estructuras nodulares semejantes a un callo (Dal Vesco *et al.*, 2014). Las plántulas *in vitro* procedentes de las semillas de *Billbergia zebrina* se utilizaron para la inducción de brotes (Rodrigues *et al.*, 2015), al igual para *Vriesea incurvata* (Sasamori *et al.*, 2016) y en *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

### 3.6.3 Establecimiento del cultivo aséptico

Una etapa crítica cuando se maneja la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es el establecimiento del cultivo aséptico. Para *Vriesea inflata* (Wawra) Wawra, las semillas fueron desinfectadas con etanol (70%) por cinco minutos y después fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (2%) con dos gotas de Tween® 20 por una hora, seguido de cinco enjuagues de agua esterilizada con el fin de evaluar su conservación *in vitro* (Pedroso *et al.*, 2010). Por otra parte, en *Aechmea veitchii* se obtuvo 96.5% de germinación en agar-agua, en el medio MS con las sales completas fue de 88.9%, y en el medio MS con los macronutrientes a media concentración fue del 100%.

Para *Racinaea crispa* este porcentaje de germinación fue ligeramente inferior, 82.2% en agar-agua, 68.26% en MS completo, y 87% en el medio MS con los macronutrientes a media concentración resultado de la desinfección de las semillas donde, se hizo una inmersión inicial en Benlate® (1 g<sup>-1</sup>) por 30 min; luego, en condiciones asépticas, una inmersión en alcohol al 70% por 15 segundos, seguido de un enjuague con agua destilada estéril. A continuación se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1% adicionado con Tween® 20 durante 30 min. Finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril antes de la siembra *in vitro* (Calderón-Arias *et al.*, 2011).

En cuanto a *Tillandsia gardneri* se utilizaron explantes de semillas y plántulas, éstas se sumergieron en etanol (70%) durante dos minutos, y después en una solución de hipoclorito de sodio, a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 25, 40 y 50%) y períodos de inmersión (5, 10, 15 minutos), finalmente, se enjuagaron tres veces en agua destilada esterilizada en condiciones asépticas, se observó de un 30-43% de germinación (Pinto *et al.*, 2012).

En cambio, para *Billbergia zebrina* se colectaron cápsulas las cuales se desinfectaron en una solución de etanol (70%) durante un minuto e hipoclorito de sodio (30%) durante 20 minutos, posteriormente se enjuagaron las semillas con agua destilada esterilizada. En las plántulas obtenidas se evaluaron los efectos de las sales y concentraciones de sacarosa *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2015).

En el caso de *Vriesea incurvata* después de colectadas las cápsulas, se lavaron con agua corriente y detergente comercial, enseguida se enjuagaron con agua destilada tres veces. Las cápsulas en condiciones asépticas, fueron desinfectadas con alcohol etílico (70%) por 30 segundos y sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (4%) más 0.1% del detergente Tween® 20 durante 15 minutos. Al finalizar, las cápsulas se enjuagaron cuatro veces en agua destilada estéril y con la ayuda de bisturí se extrajeron las semillas. Se observó un 95 % de germinación (Sasamori *et al.*, 2016).

En *Vriesea heliconioides* las semillas se extrajeron de cápsulas maduras, se lavaron con detergente comercial por cinco minutos y se enjuagaron con agua de la llave y agua destilada esterilizada. Después, se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial (30 %) y Tween® 20 (0.05 %) durante 15 min y enseguida se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada. Posteriormente, las semillas se sumergieron en Captan® (N-triclorometiltio4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida, 1 g L<sup>-1</sup>) durante 10 min y nuevamente se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada, alcanzando una germinación de 96.5 al 100% (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

### 3.6.4 Reguladores del crecimiento

Diferentes reguladores del crecimiento y combinaciones se han empleado en el cultivo *in vitro* de bromelias. En *Tillandsia fasciculata* var. *fasciculata* la inducción de brotes se logró con concentraciones iguales de BAP y AIB a 0.30 y 0.50  $\mu\text{M}$  donde se produjeron 68% y 75% de plántulas con grupos esféricos de brotes, respectivamente (Koh y Davies, 2001). Sin embargo, en *Tillandsia gardneri* se utilizó 8.87  $\mu\text{M}$  de BAP y mostró el mayor porcentaje de respuesta (91.67%) y la mayor cantidad de brotes por explante (1.92) (Pinto *et al.*, 2013).

En cambio, plántulas germinadas *in vitro* de *A. veitchii*, con AIB (4.9  $\mu\text{M}$ ), formaron brotes adventicios (60%) a partir de yemas apicales y crecimiento de la yema apical de los brotes adventicios (20%) (Calderón-Arias *et al.*, 2011). Por otro lado, la multiplicación *in vitro* de *Neoregelia concentrica* se obtuvo con 15.0  $\mu\text{M}$  de BAP y el enraizamiento con ANA (4  $\mu\text{M}$ ) con un porcentaje de 96.4% de efectividad; por otro lado, 3  $\mu\text{M}$  de ANA genera mayor número de raíces (7.120) después de los 30 días y con AIB en ambos casos fue menor (Rodrigues *et al.*, 2013).

Cabe señalar que para la etapa de inducción de estructuras nodulares semejantes a callos en *Vriesea reitzii* se utilizó ANA (4  $\mu\text{M}$ ) y TDZ (0.1  $\mu\text{M}$ ) donde se encontró un alto porcentaje, con 81.8% y 80.9% respectivamente. Además, el medio de cultivo suplementado con 4  $\mu\text{M}$  BAP causó la inducción simultánea de estas estructuras y microbrotes.

En la etapa de mantenimiento los cultivos originados a partir de BAP (4  $\mu\text{M}$ ) se mantuvieron las estructuras nodulares de textura friable y granular. Para la etapa de regeneración, AIA (4  $\mu\text{M}$ ) dio como resultado un promedio de 1,468 brotes  $\text{g}^{-1}$  de estructuras nodulares semejantes a un callo después de nueve semanas. Además, en la etapa de alargamiento, el número máximo de brotes alargados (67.3 brotes  $\text{g}^{-1}$  de estructuras nodulares semejantes a un callo) se observó al usar 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{GA}_3$  combinado con 2  $\mu\text{M}$  de AIA (Dal Vesco *et al.*, 2014).

Por otra parte, en *Vriesea heliconioides* en la etapa de inducción de brotes se utilizó BAP (10  $\mu\text{M}$ ) y ANA (1  $\mu\text{M}$ ) lográndose 6.8 brotes por explante; sin embargo, con BAP (5  $\mu\text{M}$ ) y ANA (1  $\mu\text{M}$ ) se obtuvo una mayor longitud (0.83 cm). En la etapa de multiplicación se utilizó BAP (10  $\mu\text{M}$ ) y ANA (1  $\mu\text{M}$ ) obteniéndose 7.4 brotes por explante con una longitud media de 0.62 cm. En la etapa de alargamiento de plántulas se utilizó 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  como resultado se obtuvo una longitud de 7.6 cm y en la etapa de enraizamiento *in vitro* se empleó MS a la mitad de su concentración de sales inorgánicas alcanzándose 4.6 raíces por plántula (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

### **3.6.5 Aclimatación**

Plántulas aclimatadas de *Vriesea inflata ex vitro* tuvieron una supervivencia del 100% después de tres meses con corteza fina de pino (Pedroso *et al.*, 2010). Por otro lado, en plántulas de *V. reitzii* con una altura mayor de 3 cm de longitud tuvieron una supervivencia del 95% después de 30 días en un sustrato compuesto por una mezcla de arroz carbonizado, corteza de pino y mezcla de Plantmax® (Dal Vesco *et al.*, 2014). Resultados similares se cuantificaron en plántulas de *V. incurvata* (97%) durante 150 días en sustrato comercial (Carolina Soil®, la base de turba y vermiculita) (Sasamori *et al.*, 2016).

Sin embargo, la supervivencia de plántulas de *V. heliconioides* después de 12 semanas cultivadas en fibra de coco y corteza fue de 95 y 93 %, respectivamente, mientras que en la mezcla de turba y perlita fue de 68 % (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

##### 4.1 Material vegetal

Se emplearon semillas de *Tillandsia viridiflora* (Figura 3a) colectadas de cápsulas de plantas adultas procedentes de poblaciones silvestres (Figura 3b).



**Figura 3. *Tillandsia viridiflora*. (a) Ejemplar en floración; (b) cápsulas.**

#### **4.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación**

El medio de cultivo utilizado en todos los experimentos estuvo constituido por las sales minerales del medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0.5 mg L<sup>-1</sup>), HCl-piridoxina (0.5 mg L<sup>-1</sup>), HCl-tiamina (0.1 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2.0 mg L<sup>-1</sup>) y solidificado con agar-agar (MP Biomedicals, LLC®, 7.5 g L<sup>-1</sup>). El pH se ajustó a 5.7 ±0.01 con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se llevó a cabo en autoclave vertical (AESAs® 300) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión durante 20 min. Los cultivos se incubaron a 26 ±2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad e intensidad luminosa de 45 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proporcionada por luz blanca fría de lámparas LED.

#### **4.3 Cultivo aséptico**

Para establecer el cultivo aséptico se seleccionaron 1,200 semillas sanas de cada edad con un tamaño uniforme. Se lavaron con agua y detergente comercial (Roma®) en agitación continua durante 5 min seguido de enjuagues con agua del grifo hasta eliminar los restos del detergente.

La desinfección superficial de las semillas se hizo en condiciones asépticas usando el procedimiento reportado para la bromelia *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). Las semillas se sumergieron en una solución de plata coloidal estable 3% v/v (Microdyn®, 0.35% de ingrediente activo), 30% v/v de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl, Cloralex®, 6% de cloro activo) y 0.5 mL L<sup>-1</sup> de Tween 20® durante 15 min.

Después se hicieron cinco enjuagues con agua destilada esterilizada. Posteriormente se sumergieron en solución fungicida de Captan® (4 g L<sup>-1</sup>) y 0.5 mL L<sup>-1</sup> de Tween® 20 durante 10 min y se sembraron por grupos de 10 en frascos de cultivo de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo MS con la mitad de concentración de sales.

#### **4.3.1 Variables cuantificadas**

Durante las primeras cuatro semanas, cada tercer día, se evaluó: contaminación por bacterias (%) y contaminación por hongos (%).

#### **4.4 Establecimiento *in vitro***

##### **4.4.1. Germinación**

Para inducir la germinación *in vitro* o la organogénesis a partir de plántulas germinadas *in vitro*, se sembraron semillas en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 15 mL de medio MS con 50% de la concentración de sales. Se evaluaron dos edades de semilla (ocho y diez meses) y diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) combinadas con ácido naftalenacético (ANA) más un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la germinación *in vitro* y organogénesis de *Tillandsia viridiflora*.**

Tratamiento (Núm.)	BAP		ANA	
	(mg L <sup>-1</sup> )	(µM)	(mg L <sup>-1</sup> )	(µM)
1 (Testigo)	0.0	0.00	0.0	0.0
2	0.5	2.21	0.1	0.5
3	0.5	2.21	0.2	1.0
4	0.5	2.21	0.4	2.1
5	1.0	4.43	0.1	0.5
6	1.0	4.43	0.2	1.0
7	1.0	4.43	0.4	2.1
8	2.0	8.87	0.1	0.5
9	2.0	8.87	0.2	1.0
10	2.0	8.87	0.4	2.1

A las ocho semanas se hizo un subcultivo al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 100% de concentración de sales y vitaminas, adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y sin reguladores de crecimiento.

#### 4.4.1 Variables cuantificadas

Al iniciar, se cuantifico el número de semillas por cápsula y el peso de 1,000 semillas con el apéndice recortado. Durante las primeras cuatro semanas, cada tercer día, se cuantificó la germinación (%) así como el inicio y término de la misma (número de días), la aparición de la primera hoja (días) y la aparición del sistema radicular (días).

También cada 14 días, durante un periodo de 21 semanas se contabilizó las plántulas normales (%), las plántulas anormales (%), callos (%; calculada por el número de explantes que formaron callos) y ennegrecimiento (%).

#### **4.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fueron 10 semillas sembradas por frasco de cultivo. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### **4.4.3 Viabilidad de semillas**

La viabilidad se cuantificó con la germinación de las mismas. Para ello, se probaron dos períodos de almacenamiento: 1) semillas de ocho meses de edad almacenadas en refrigeración ( $10^{\circ}$  C) durante 10, 16 y 38 semanas y 2) Semillas de 10 meses de edad almacenadas en refrigeración ( $10^{\circ}$  C) por 8, 14 y 25 semanas. El almacenamiento se hizo en recipientes de polipropileno de 100 mL de capacidad. De cada periodo de almacenamiento se tomaron lotes de 50 semillas que se sembraron en medio MS con 50% de la concentración de sales.

##### **4.4.3.1 Variables cuantificadas**

Después de cinco semanas se cuantificó porcentaje de germinación e inicio y término de la misma (número de días).

##### **4.4.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 5 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fueron 10 semillas por frasco de cultivo. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## 4.5 Regeneración de plántulas por organogénesis

### 4.5.1 Inducción de brotes

Para inducir la organogénesis se utilizó como explante, plántulas germinadas *in vitro* de 25 semanas de edad y de 2 cm de altura, las cuales se sembraron en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 15 mL de medio MS adicionado con BAP, ANA y un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 2). Para observar y cuantificar las respuestas morfogénicas promovidas por los reguladores de crecimiento, de acuerdo con el tiempo de exposición, se evaluaron tres subcultivos a medio MS sin reguladores de crecimiento cada cuatro semanas. Un grupo de cinco frascos con tres plántulas cada uno se transfirió de los tratamientos de inducción a medio sin reguladores a las cuatro semanas, otro grupo de cinco frascos a las ocho semanas y un tercer grupo de cinco a las 12 semanas.

**Cuadro 2. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) evaluadas en la inducción de brotes de *Tillandsia viridiflora* a partir de plántulas *in vitro*.**

Tratamiento (Núm.)	BAP		ANA	
	(mg L <sup>-1</sup> )	(μM)	(mg L <sup>-1</sup> )	(μM)
1 (Testigo)	0.0	0.00	0.0	0.0
2	0.50	2.21	0.1	0.5
3	0.75	3.32	0.1	0.5
4	1.00	4.43	0.1	0.5
5	1.25	5.54	0.1	0.5
6	1.50	6.65	0.1	0.5
7	2.00	8.87	0.1	0.5

#### 4.5.1.1 Variables cuantificadas

Cada dos semanas, durante un periodo de 12 semanas, se contabilizó la brotación (B, %; calculada por el número de explantes que formaron brotes), número de brotes por explante (BE), formación de callo (FC, %; calculada por el número de explantes que formaron callos) y ennegrecimiento (%).

#### 4.5.1.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 15 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres plántulas. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5.2 Multiplicación de brotes

Brotes con longitud de 0.9 a 1.4 cm se cultivaron en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad que contenían 15 mL de medio MS con diferentes concentraciones de BAP combinadas con 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA y un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.5  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético (ANA) evaluados en la multiplicación de brotes de *Tillandsia viridiflora*.**

Tratamiento (Núm.)	BAP	
	(mg L <sup>-1</sup> )	( $\mu\text{M}$ )
1 (Testigo)	0.00	0.00
2	0.50	2.21
3	0.75	3.32
4	1.00	4.43
5	1.25	5.54
6	1.50	6.65

Para observar y cuantificar las respuestas morfogénicas promovidas por los reguladores de crecimiento de acuerdo con el tiempo de exposición se evaluaron dos subcultivos a medio MS sin reguladores de crecimiento. Un grupo de cinco frascos con tres brotes cada uno se transfirió de los tratamientos de multiplicación a medio sin reguladores a las ocho semanas y otro grupo de cinco a las 12 semanas.

#### **4.5.2.1 Variables cuantificadas**

Cada dos semanas, durante un periodo de 12 semanas, se contabilizaron las mismas variables de la etapa de inducción indicadas en el apartado 3.5.1.1.

#### **4.5.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres brotes. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### **4.5.3 Alargamiento de brotes**

Para promover el alargamiento, grupos de brotes de una longitud promedio de 0.4 cm, procedentes de la etapa de multiplicación, se colocaron en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio básico MS con ácido giberélico (AG<sub>3</sub>; 0, 1.44, 2.88, 4.33, 5.77  $\mu\text{M}$ ). A las tres semanas se hizo un subcultivo a los mismos tratamientos de AG<sub>3</sub>.

#### 4.5.3.1 Variables cuantificadas

Después de seis semanas se cuantificó la longitud de brotes (cm) y número de brotes por explante.

#### 4.5.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 15 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue un grupo de brotes establecidos en cada frasco de cultivo. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5.4 Enraizamiento de plántulas

Brotes con una longitud promedio de 1.0 cm se plantaron en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ANA, ácido indol-3-butírico (AIB) y un testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 4). Se hizo un subcultivo a las tres semanas.

**Cuadro 4. Concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) evaluadas en el enraizamiento de brotes *in vitro* de *Tillandsia viridiflora*.**

Tratamiento (Núm.)	ANA		AIB	
	(mg L <sup>-1</sup> )	( $\mu$ M)	(mg L <sup>-1</sup> )	( $\mu$ M)
1 (Testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.19	1.07	0.00	0.00
3	0.38	2.15	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.22	1.07
5	0.00	0.00	0.44	2.15

#### **4.5.4.1 Variables cuantificadas**

A las seis semanas se cuantificó el enraizamiento (%), calculado por el número de brotes que formaron raíces), número de raíces por brote (RB), longitud de raíz (LR, cm) y formación de callo (FC, %).

#### **4.5.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fueron dos brotes por frasco de cultivo. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

#### **4.5.5 Aclimatación de plántulas**

En esta etapa se evaluaron plántulas enraizadas *in vitro* con dos alturas promedio de 4.5 y 6.5 cm. Las plántulas se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua tibia y destilada para retirar el medio de cultivo. A continuación, se sumergieron en solución fungicida (Captan®, 0.5 g L<sup>-1</sup>) durante 20 min y se sembraron en vasos de poliestireno expandido de 118 mL de capacidad con dos tipos de sustrato: turba+perlita (1:1) y corteza de pino. Después se aplicó riego con 50% de la concentración de sales del medio MS. Para finalizar el trasplante, las plántulas se cubrieron con vasos de poliestireno cristal (GPPS) de 9x15 cm (diámetro/alto) sellados con un domo del mismo material.

Las plántulas se colocaron a temperatura ambiente promedio de  $23\pm 3$  °C con fotoperiodo de 12 h. Durante las dos primeras semanas se regaron con 50% de la concentración de sales del medio MS y al final de este periodo se hicieron tres perforaciones para favorecer la circulación del aire. Posteriormente se fertilizaron con la solución del medio MS al 25% de la concentración de sales y se retiraron los domos a las cuatro y seis semanas después del trasplante.

#### **4.5.5.1 Variables cuantificadas**

Después de 11 semanas se cuantificó el porcentaje de supervivencia, longitud de la plántula (LP, cm), longitud de raíz (LR, cm), número de hojas (NH).

#### **4.5.5.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar simple con 20 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue una plántula en cada vaso. Se hizo un análisis de varianza con el programa estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ( $p\leq 0.05$ ).

En resumen, esta investigación abordó desde la germinación de semillas, su viabilidad y la regeneración *in vitro* por organogénesis directa hasta la aclimatación de plántulas. En ese sentido, la metodología utilizada para determinar la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* se sintetiza en un diagrama de flujo (Figura 4).

#### 4.6 Resumen esquemático metodológico

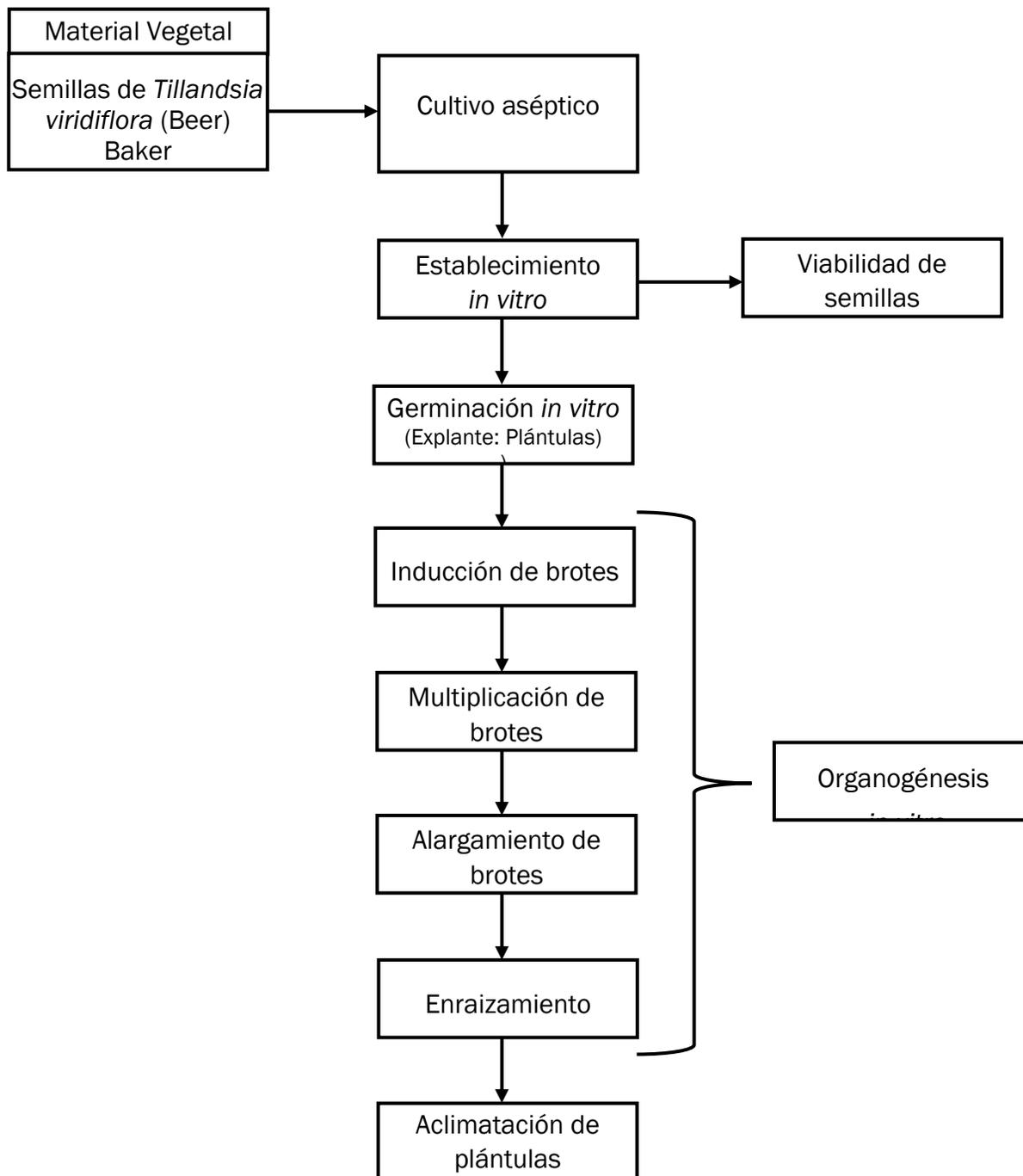


Figura 4. Diagrama de flujo para la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora*.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Cultivo aséptico

La desinfección superficial de las semillas de ocho meses de edad de *T. viridiflora* fue efectiva (100%) para la eliminación de microorganismos contaminantes, sin embargo, en semillas de diez meses de edad fue de 82.5%. Después de 21 semanas del establecimiento *in vitro* no se observó contaminación en la superficie del explante ni en el medio de cultivo. Estos resultados coinciden con los obtenidos en semillas de *Tillandsia gardneri* donde se obtuvo 100% de semillas libres de contaminación al utilizar diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión (10 o 20% por 5, 10 o 15 min; 25% por 5 o 10 min; y 50% por 5 min) (Pinto *et al.*, 2012 ). Además, se observó que el ingrediente activo de Captan® no resultó fitotóxico en la germinación de las semillas y crecimiento de plántulas de *T. viridiflora*. Esta tolerancia se ha reportado también en semillas de otras especies tales como *Vigna radiata* L. (Devamani *et al.*, 2017) y *Mammillaria plumosa* (Téllez-Román *et al.*, 2017).

### 5.2 Establecimiento *in vitro*

Las semillas de *T. viridiflora* cultivadas en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de BAP y ANA favorecieron la germinación, la formación de callos nodulares y la organogénesis a partir de las plántulas germinadas.

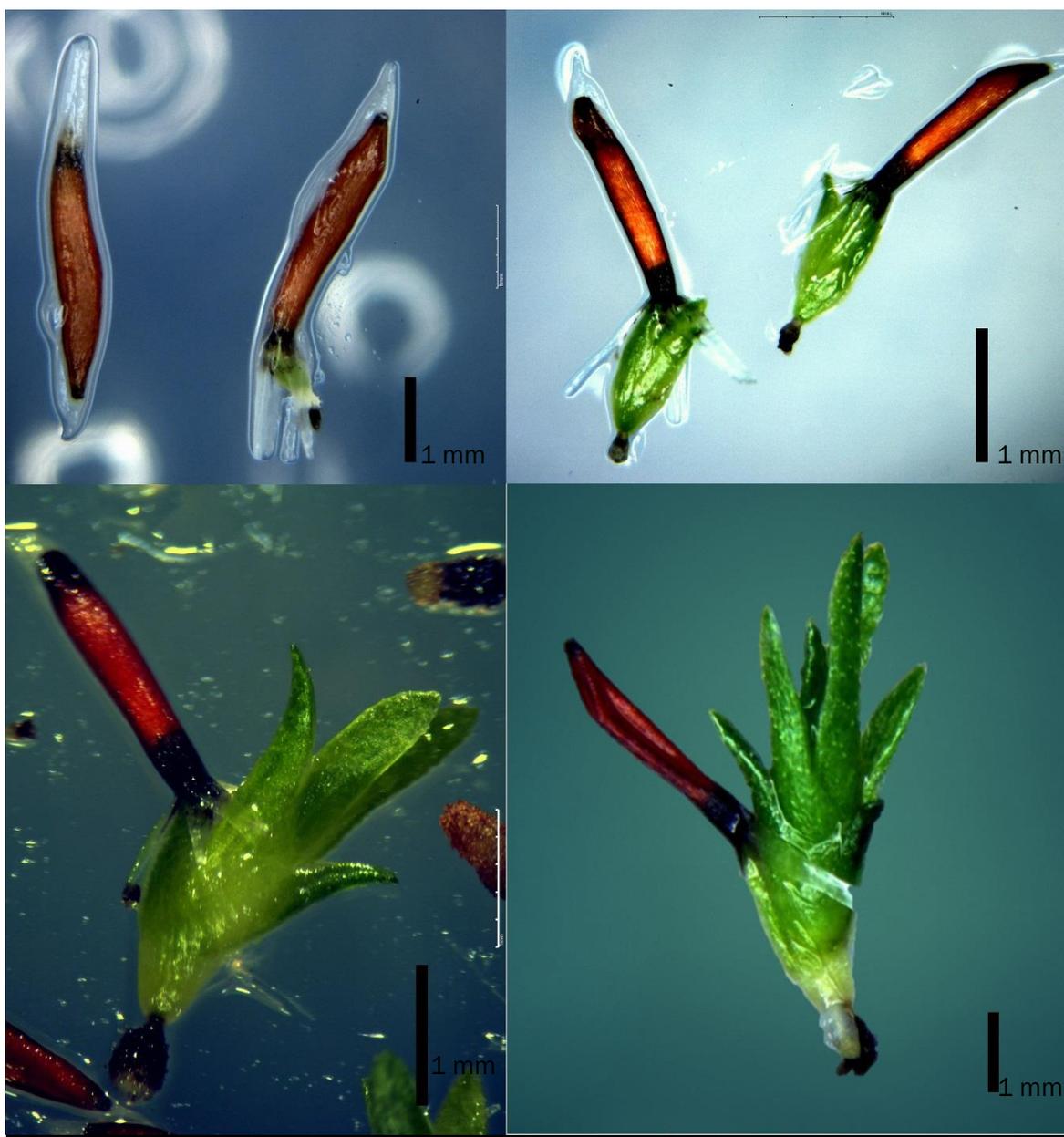
La germinación *in vitro*, considerada como la emergencia de la radícula, en semillas de diez meses de edad inició a los 12 días y finalizó después de 30 días de la siembra (Figura 5). En contraste, las semillas de ocho meses de edad requirieron más tiempo para la germinación, entre 15 y 35 días después de la siembra.

La emergencia de la primera hoja (L1) se observó a los 24 días de la siembra y el sistema radicular a los 71 días. En condiciones *in vitro*, para *Aechmea blanchetiana* la germinación se presentó entre los cinco y diez días después de la siembra, para las semillas colocadas bajo luz, y hasta 15 días después las que estuvieron en oscuridad.

Para *A. distichantha* la germinación inició a los cinco días después de la siembra y continuó hasta 40 días después para las semillas mantenidas bajo luz y oscuridad, respectivamente (Santa-Rosa *et al.*, 2013). Ello indica que el grado de madurez y las condiciones de luz influyen en la germinación de las semillas de bromelias (Silveira *et al.*, 2009).

Después de 21 semanas del establecimiento *in vitro*, las semillas de ocho y diez meses de edad de *T. viridiflora* alcanzaron crecimiento similar; la altura promedio fue de 16.8 mm y el número de raíces de 2.1 por plántula.

Las cápsulas colectadas de *T. viridiflora* contenían en promedio 500 semillas y el peso de 1,000 semillas, ya sin el apéndice plumoso, fue de 400 mg. La cantidad de semillas por cápsula de bromelias del género *Tillandsia* es variable; en *T. stricta* se reportaron en promedio 27 semillas por fruto (Missagia y Alves, 2015.), 115 semillas en *T. achyrostachys*, en *T. caput-medusae* fueron 106 semillas, 92 semillas en *T. circinnatioides*, *T. hubertiana* con 190 semillas y *T. schiedeana* con 99 semillas (Flores-Palacios *et al.*, 2015). El máximo número reportado es de 2,000 semillas por fruto en *T. califanii* Rauh (García-Suárez *et al.*, 2006). En cuanto al peso de las semillas, en *Nidularium innocentii* se reportó que 1,000 semillas pesan 2.137 g (Pereira *et al.*, 2010).



**Figura 5. Germinación *in vitro* de semillas de *Tillandsia viridiflora* de diez meses de edad en medio MS con 50% de concentración de sales después de 12 semanas de cultivo.**

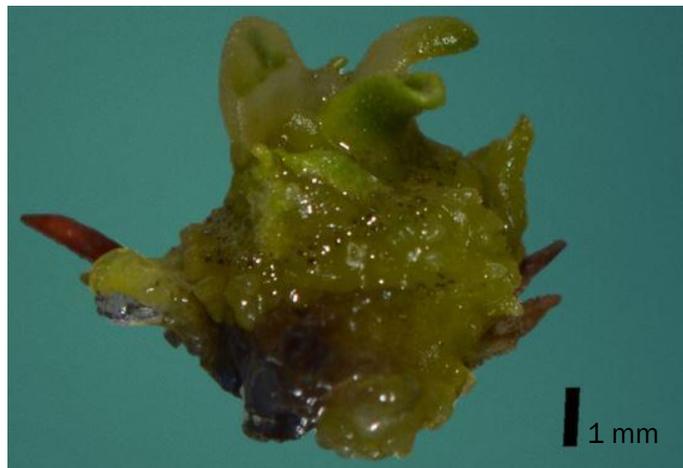
La tasa de germinación de *T. viridiflora* en semillas de 10 meses de edad (después de la polinización) fue de 82.9%, mientras que, las semillas de 8 meses fue de 94.0%. En semillas maduras de *Vriesea incurvata*, bajo condiciones similares *in vitro*, se reportó la germinación de 93.99% (Pulido-Rueda *et al.*, 2018).

En *Neoglaziovia variegata* se reportaron resultados similares con rangos de germinación de 100 y 80% en semillas provenientes de frutos maduros e inmaduros, respectivamente (Silveira *et al.*, 2009). Calderón-Arias *et al.* (2011) señalan que las semillas de bromelias son sensibles a niveles altos de sales en el medio de cultivo en la etapa inicial. Pulido-Rueda *et al.* (2018) reportaron que la mitad de la concentración de sales del medio MS es favorable para promover la germinación en *V. incurvata*, mientras que Andrade y Tamaki (2016) mencionan que el medio de cultivo debe formularse para cada especie para promover el crecimiento *in vitro*.

La germinación de semillas de bromelias en su ambiente natural es variable y está influenciada por las condiciones ambientales. En *Vriesea friburgensis* se encontró un rango de germinación entre 70.15 y 76.44% (Paggi *et al.*, 2013). Sin embargo, en *Vriesea sanguinolenta*, *V. gladioliflora* y *V. heliconioides* se reportan porcentajes de germinación entre 79 y 100%. Para *Tillandsia monadelphica*, *T. bulbosa*, *T. anceps*, *T. subulifera* y *T. fasciculata* los porcentajes pueden ser entre 97 y 100% (Correa y Zotz, 2014).

Por otra parte, además de la germinación, los tratamientos evaluados también promovieron la formación de callos después del segundo mes de iniciado el cultivo. Esta respuesta se observó en semillas inmaduras (6.8%) y semillas maduras (2.6%) sin importar la concentración o la combinación de reguladores de crecimiento del medio de cultivo. Estos callos en bromelias se han reportado como estructuras nodulares y se desconoce si se trata de callos organogénicos o embriogénicos (Figura 6).

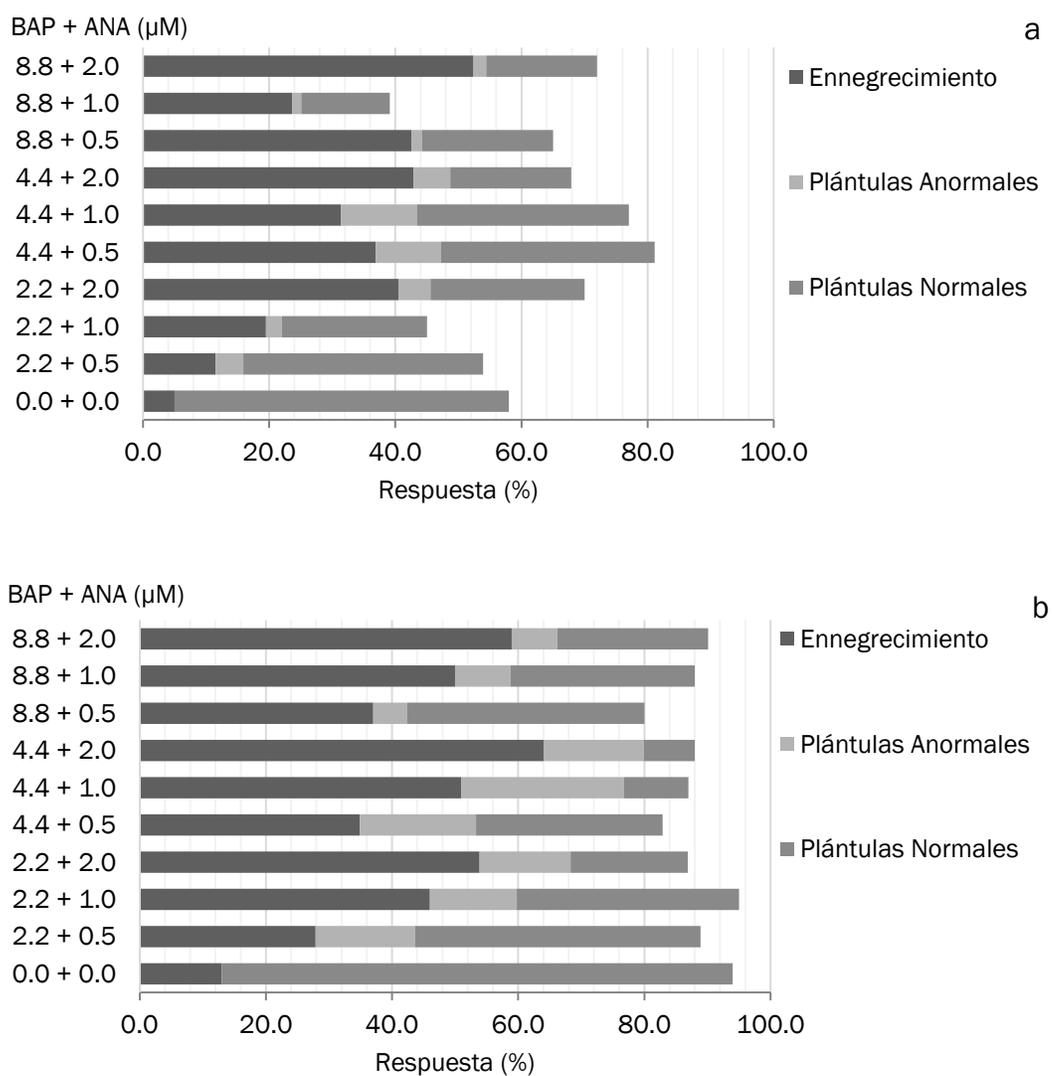
Después de 12 semanas en el medio de cultivo se observó la formación de primordios de yemas a partir de estas estructuras.



**Figura 6. Estructuras nodulares similares a callos en semillas de *Tillandsia viridiflora* desarrolladas en medio MS sin reguladores de crecimiento.**

Las bromelias son la única familia botánica donde se ha reportado una tercera ruta morfogénica *in vitro* alternativa de la organogénesis y embriogénesis somática. Este sistema de regeneración se definió como cultivos de nódulos (CN) y tienen un alto potencial regenerativo, que culmina en la producción de múltiples brotes adventicios en condiciones de cultivo adecuadas (Corredor-Prado *et al.*, 2015).

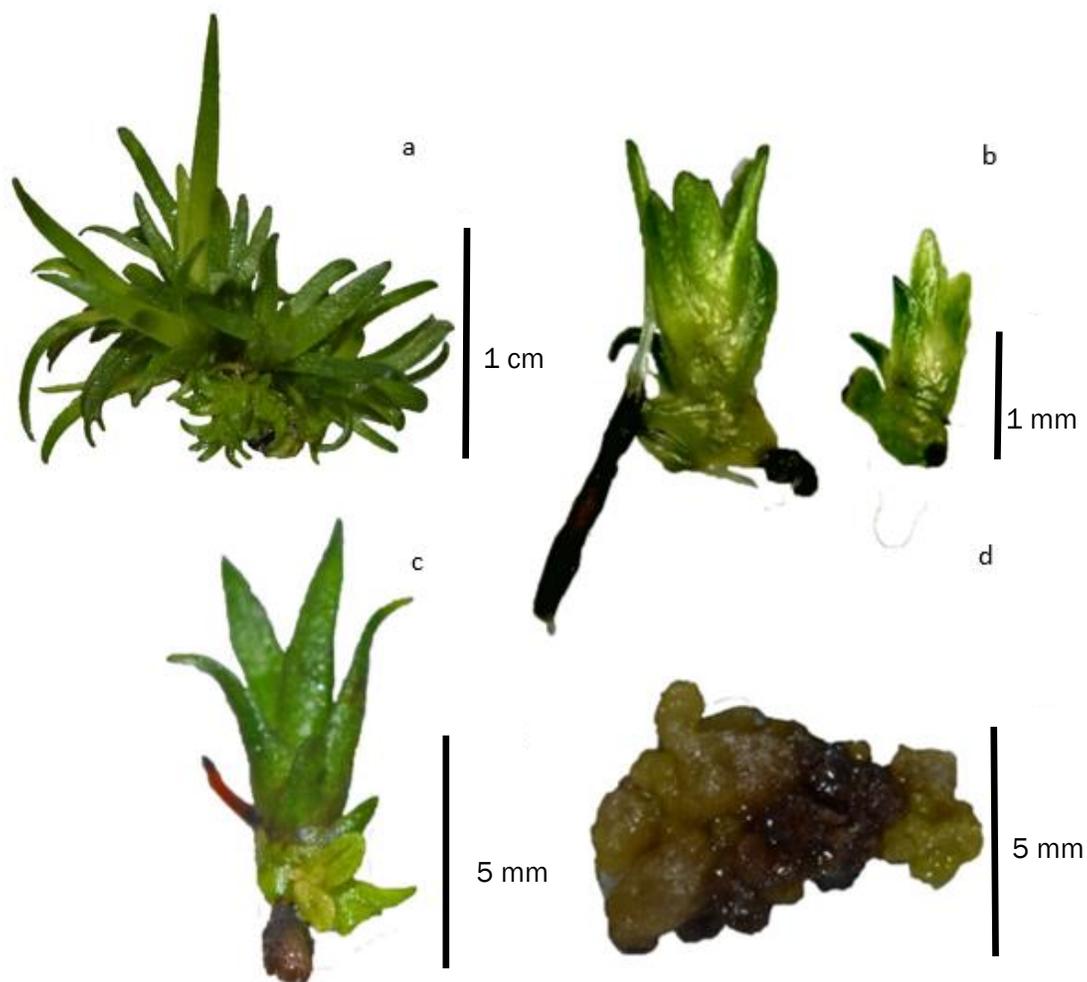
En la germinación se presentó 50.7% de ennegrecimiento en semillas de ocho meses de edad y 31.9% en semillas de diez meses de edad después de 12 semanas de establecido el cultivo (Figura 7). Esta respuesta tuvo mayor incidencia en los explantes cultivados con altas concentraciones de reguladores de crecimiento (0.44  $\mu\text{M}$ , 0.88  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.10  $\mu\text{M}$ , 0.20  $\mu\text{M}$  de ANA) y también estuvo asociada con la formación de callos (Figura 8d). Se ha mencionado que el ennegrecimiento puede estar relacionado con el contenido de sales del medio de cultivo en la etapa inicial (Calderón-Arias *et al.*, 2011).



**Figura 7. Respuestas *in vitro* observadas en semillas de *Tillandsia viridiflora* cultivadas en medio MS con la mitad de concentración de sales y diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y Ac. Naftalenacético (ANA). a) Semillas de 10 y b) 8 meses de edad.**

Del total de semillas germinadas, las plántulas normales aparecieron en un 36% sin importar el grado de madurez de las semillas (Figura 7).

Por otra parte, las plántulas anormales (Figura 8b), caracterizadas por tener un crecimiento limitado, tuvieron una incidencia de 14.26% en semillas de ocho meses de edad y 7.18% para semillas de diez meses, y después de las 20 semanas las plántulas se ennegrecieron.



**Figura 8. Respuestas morfológicas *in vitro* observadas en semillas de *Tillandsia viridiflora* después de 16 semanas de cultivo en medio MS. a) Brotes inducidos con 0.44  $\mu$ M de BAP y 0.05  $\mu$ M de ANA, b) Plántulas anormales con 0.44  $\mu$ M de BAP y 0.20  $\mu$ M de ANA, c) Inducción de brotes con 0.22  $\mu$ M de BAP y 0.05  $\mu$ M de ANA, d) Callos con ennegrecimiento.**

Con estos resultados se observó que las semillas de ocho meses de edad, al ser fisiológicamente menos maduras, tienen la capacidad de mostrar otras respuestas diferentes de la formación de brotes, aunque la germinación se retrase ligeramente.

Además de la germinación y la formación de callos, se observó la organogénesis en la base de las plántulas (Figura 8a y 8c). Esta respuesta se presentó en todos los tratamientos que contenían reguladores de crecimiento (BAP y ANA) con excepción del testigo.

En conjunto, la cantidad de plántulas recién germinadas que formaron brotes fue de 29.6% después de las 8 semanas de cultivo. Para observar el crecimiento de los brotes fue necesario subcultivar los explantes a medio MS sin reguladores de crecimiento. Estos brotes fueron de un tamaño menor a 2 mm y se les dio seguimiento durante 21 semanas; se constató que el crecimiento fue lento y ello impidió contabilizarlos.

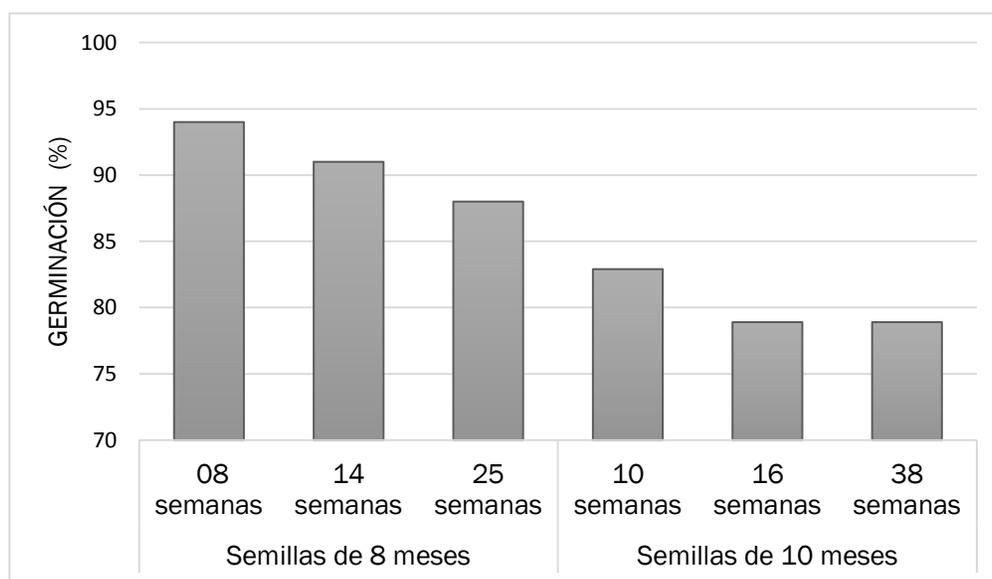
En la literatura son limitados los estudios donde se ha reportado la siembra de semillas directamente en medio de cultivo con reguladores de crecimiento en otras especies de bromelias. En *Vriesea reitzii* se formaron estructuras nodulares semejantes a callos al utilizar ANA (4  $\mu\text{M}$ ) y TDZ (0.1  $\mu\text{M}$ ) donde se encontraron porcentajes mayores al 80% respectivamente después de seis semanas de cultivo (Dal Vesco *et al.*, 2014). Por otra parte, en semillas de *Tillandsia eizii* se reportó que 14.6 % de los explantes generaron brotes en el medio Knudson con 2.22  $\mu\text{M}$  de BAP y 5.37  $\mu\text{M}$  de ANA, mas 2% de sacarosa (Pickens *et al.*, 2003).

### 5.2.1 Viabilidad de semillas

Las semillas de ocho meses de edad presentaron mayor porcentaje de germinación en todos los tratamientos en comparación con las de diez meses. Después de cinco semanas del establecimiento, las semillas de ocho y diez meses de edad almacenadas a 10°C, durante 10 y 8 semanas, respectivamente, el porcentaje de germinación se mantuvo entre 94 y 82.9 %, mientras que en las semillas almacenadas durante 38 y 25 semanas, la germinación se redujo a 78.9 y 88 %, respectivamente (Cuadro 5, Figura 9).

**Cuadro 5. Germinación (% , desviación estándar) *in vitro* de semillas de ocho y diez meses de edad en *T. viridiflora* almacenadas a 10 °C durante 38 y 25 semanas.**

Edad	Germinación (%)		
	8-10 semanas	14-16 semanas	25-38 semanas
10 Meses	82.9 (0.8)	78.9 (1.4)	78.9 (1.1)
8 Meses	94.0 (0.8)	91.0 (1.0)	88.0 (1.0)



**Figura 9. Comportamiento de la germinación *in vitro* de semillas de *Tillandsia viridiflora* de ocho y diez meses de edad almacenadas a 10 °C por 38 semanas.**

En *T. viridiflora* no se han hecho estudios que documenten la germinación y el almacenamiento de semillas y los resultados obtenidos en el presente estudio son básicos para implementar estrategias de conservación y aprovechamiento de la especie. En bromelias, se ha reportado que algunos géneros como *Encholirium* no presentan cambios significativos en la germinación de semillas después de almacenarlas durante un año a 4 y -20 °C (Tarré *et al.*, 2007). En el caso de *Nidularium innocentii* se reportó que la germinación fue de 91 % cuando las semillas se almacenaron a 4 °C comparado con 86 % cuando se almacenaron a 18 °C por 90 días; también se determinó que no hubo diferencia entre usar materiales de polipropileno y papel en el almacenamiento (Pereira *et al.*, 2010).

En algunas especies del género *Tillandsia* se ha reportado que la germinación se reduce después de almacenar las semillas por determinado tiempo. En semillas de *T. caputmedusae* la germinación se redujo de un 99.5% hasta un 81.7% y para *T. recurvata* se encontró el 8% de germinación después de 450 días de almacenamiento a 25 °C (Flores-Palacios *et al.*, 2015). Al igual, en *Pseudananas sagenarius* la germinación disminuyó de un 78% hasta un 50% después de 36 meses de almacenamiento a 4 °C (De Castro y Silveira, 2010).

### **5.3 Regeneración de plántulas por organogénesis directa**

#### **5.3.1 Inducción de brotes**

Los tratamientos con reguladores de crecimiento afectaron significativamente la brotación y el número de brotes por explante ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 1). En todos los tratamientos se presentó la brotación, incluido el testigo; sin embargo, fue de 100% en las concentraciones de 2.21, 3.32 y 4.43  $\mu\text{M}$  de BAP combinadas con 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA después de 12 semanas de cultivo.

La mayor cantidad de brotes por explante (10.4) se obtuvo con 6.65  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA a las 12 semanas. En contraste, con el testigo sin reguladores de crecimiento sólo se produjeron 0.3 brotes (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Porcentaje de brotación (B) y número de brotes por explante (BE) inducidos en plántulas *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro, ocho y doce semanas de cultivo.**

BAP + ANA ( $\mu\text{M}$ )	4 semanas		8 semanas		12 semanas	
	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)
0 + 0	20.0 b	0.3 d	20.0 b	0.3 e	20.0 b	0.3 d
2.21 + 0.5	86.7 a	3.1 c	80.0 a	2.6 d	100.0 a	5.2 c
3.32 + 0.5	86.7 a	5.5 abc	73.3 a	3.6 cd	100.0 a	8.3 b
4.43 + 0.5	73.3 a	6.8 a	100.0 a	5.4 bc	100.0 a	9.0 ab
5.54 + 0.5	73.3 a	6.1 ab	100.0 a	5.6 b	86.7 a	9.0 ab
6.65 + 0.5	66.7 a	4.0 bc	86.7 a	9.7 a	93.3 a	10.4 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Los brotes fueron visibles a partir de la segunda semana de cultivo en los tratamientos con reguladores de crecimiento; se formaron en la base de la plántula, fueron de coloración verde claro y morfológicamente uniformes. Los brotes crecieron lentamente y después de 12 semanas no superaron 1 o 2 mm de longitud; por esta razón fue necesario un microscopio estereoscópico para contabilizarlos.

A diferencia de los brotes inducidos en plántulas recién germinadas en los tratamientos de germinación, en esta etapa no se presentaron plántulas ennegrecidas y tampoco hubo formación de callos (Figura 10).

En bromelias es limitada la información sobre propagación *in vitro*, sin embargo, se ha reportado que las respuestas organogénicas llegan a ser variables, lo que indica que el genotipo ejerce gran influencia.

En *T. fasciculata* var. *fasciculata* la inducción de brotes se logró con concentraciones de BAP 0.3  $\mu\text{M}$  + ANA 0.3  $\mu\text{M}$  y BAP 0.5  $\mu\text{M}$  + ANA 0.5  $\mu\text{M}$  donde se produjo una brotación de 68% y 75% de las plántulas con grupos de brotes, respectivamente (Koh y Davies, 2001). Sin embargo, en *Tillandsia gardneri* el mayor porcentaje de brotación (91.67%) y la mayor cantidad de brotes por explante (1.92) se indujeron con 8.87  $\mu\text{M}$  de BAP (Pinto *et al.*, 2013). En el caso de *Vriesea heliconioides* se obtuvieron 6.8 brotes explantes con 10  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de ANA; sin embargo, la mayor longitud de brotes (0.83 cm) se alcanzó con 5  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de ANA (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). Por otra parte, en *Orthophytum grossiorum* con medio líquido estacionario suplementado con 10  $\mu\text{M}$  de BAP, el 18.33% de plántulas generó brotes adventicios (Manfio *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Inducción de brotes a partir de plántulas de *Tillandsia viridiflora* con 6.65  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA después de 12 semanas de cultivo.

### 5.3.2 Multiplicación de brotes

Los tratamientos con reguladores de crecimiento afectaron significativamente la brotación y el número de brotes por explante ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 2). En todos los tratamientos se presentó la brotación, incluido el testigo; sin embargo, fue de 100% en las concentraciones de 4.4, 5.5 y 6.6  $\mu\text{M}$  de BAP combinadas con 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA después de 12 semanas de cultivo. La mayor cantidad de brotes por explante (13.0) se obtuvo con 4.4  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa con los 12.8 brotes obtenidos con 3.3  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA a las 12 semanas. En contraste, con el testigo sin reguladores de crecimiento sólo se produjeron 0.4 brotes (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Brotación (B, %) y número de brotes por explante (BE) inducidos en plántulas *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* con 6-bencilamminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las ocho y doce semanas de cultivo.**

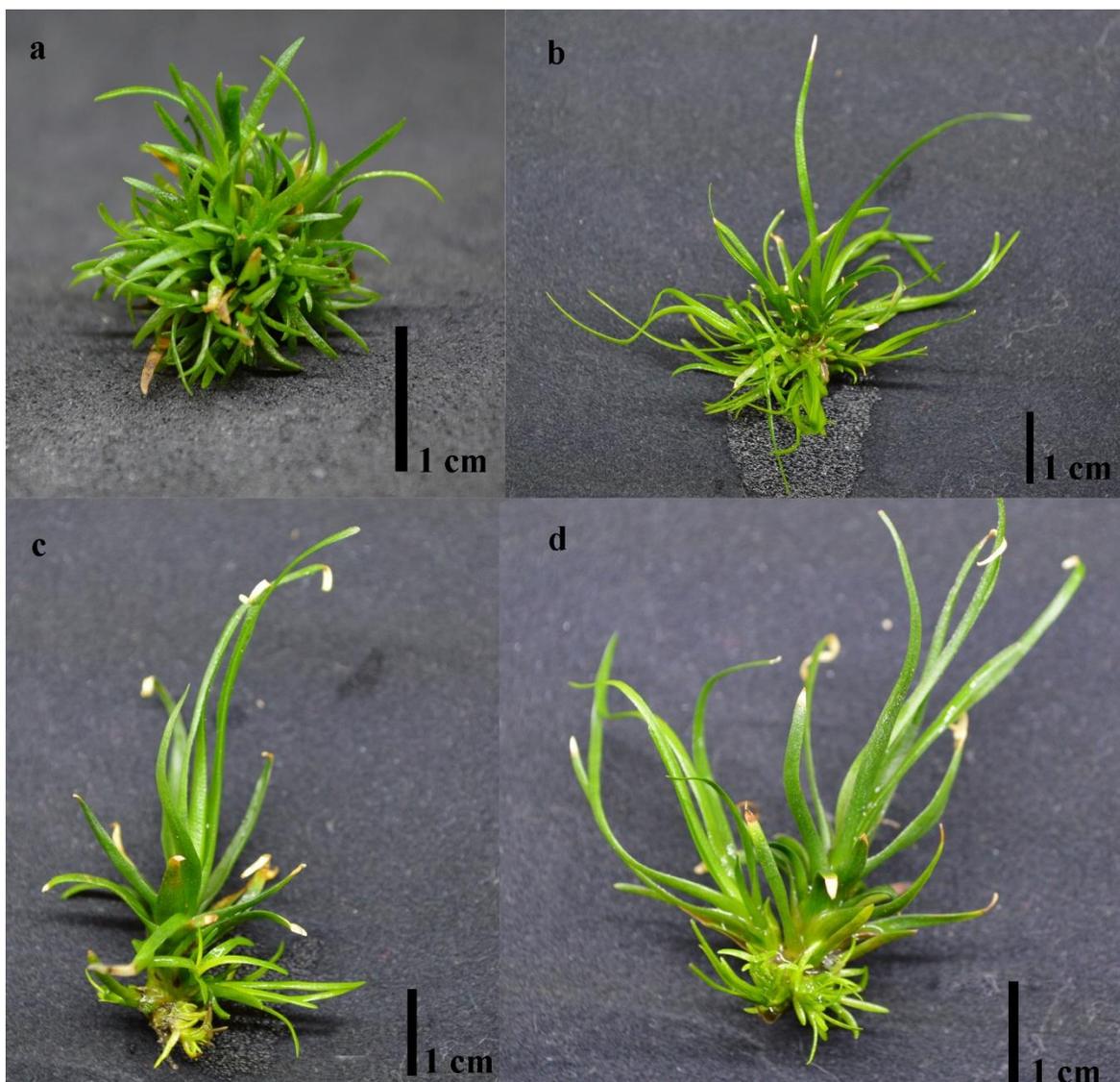
BAP + ANA ( $\mu\text{M}$ )	8 semanas		12 semanas	
	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)
2.21 + 0.5	80.0 a	2.2 cd	93.3 a	6.3 b
3.32 + 0.5	93.3 a	8.7 a	86.6 a	12.8 a
4.43 + 0.5	73.3 a	4.5 b	100.0 a	13.0 a
5.54 + 0.5	86.6 a	3.4 bc	100.0 a	5.7 b
6.65 + 0.5	73.3 a	1.8 de	100.0 a	6.9 b

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Al igual que lo observado en la inducción, los brotes fueron visibles a partir de la segunda semana de cultivo en los tratamientos con reguladores de crecimiento (BAP y ANA); se formaron en la base de la plántula, fueron de coloración verde claro y morfológicamente uniformes.

El crecimiento fue similar a la fase de inducción, los brotes crecieron lentamente y después de 12 semanas se observaron, con ayuda del microscopio, brotes de 1 o 2 mm de longitud. En esta fase, al igual que en la de inducción, no se presentó la formación de callos (Figura 11).

En la familia bromeliaceae son limitados los estudios sobre morfogénesis *in vitro*. Se han publicado avances en la micropropagación de bromelias ornamentales separando la inducción de la multiplicación de brotes (Guerra y Dal Vesco, 2010), sin embargo, estas dos etapas se encuentran estrechamente relacionadas. Los mejores resultados para *N. procerum* se obtuvieron con 4  $\mu\text{M}$  de BAP con 14.9 brotes por explante y para *N. innocentii* fue de 8  $\mu\text{M}$ , con 2.8 brotes por explante (Da Silva *et al.*, 2012).



**Figura 11. Multiplicación de brotes de *Tillandsia viridiflora* con a) 4.43  $\mu\text{M}$  de BAP, b) 3.32  $\mu\text{M}$  de BAP, c) 5.54  $\mu\text{M}$  de BAP y d) 2.21  $\mu\text{M}$  de BAP combinadas con 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA después de 12 semanas de cultivo.**

Similares resultados se obtuvieron en *Tillandsia gardneri*, el mayor porcentaje de brotación (91.6%) y la mayor cantidad de brotes por explante (1.9) se alcanzaron con 8.87  $\mu\text{M}$  de BAP (Pinto *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la combinación de BAP y ANA produce una respuesta positiva en la morfogénesis *in vitro* de bromelias. En *Aechmea blanchetiana* se produjeron 105.6 brotes por explante y 223.8 en *Aechmea distichantha* con 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA y 2.2  $\mu\text{M}$  de BAP (Santa-Rosa *et al.*, 2013).

En *Vriesea cacuminis* se obtuvieron 9.3 brotes por explante con 15  $\mu\text{M}$  de BAP y 4.5  $\mu\text{M}$  de ANA (Resende *et al.*, 2016). En el caso de *Vriesea heliconioides* la adición de 10  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de ANA favorecieron la producción de 7.4 brotes por explante con una longitud promedio de 0.62 cm (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Veltcheva y Svetleva, (2005) indicaron que la 6-bencilaminopurina (BAP) aumenta la capacidad de regeneración *in vitro* porque estimula la división celular; a medida que se producen más células en un tejido, el potencial de regeneración es mayor. La cantidad de brotes reportada para diferentes especies de bromelias demuestran la influencia que tiene el genotipo y los reguladores de crecimiento en las respuestas morfogénicas. En la literatura sobre regeneración de bromelias la BAP es de los reguladores más usados, sin embargo, también se ha reportado el uso de 2  $\mu\text{M}$  de N6 (2-isopentenil) adenina (2-iP) para la proliferación de nódulos semejantes a un callo en *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014) y en *Vriesea friburgensis* Mez (Corredor-Prado *et al.*, 2015). La zeatina (0.05 y 2.2  $\mu\text{M}$ ) se reportó para la multiplicación en *Puya berteroniana* (Viehmannova, *et al.*, 2016) y la cinetina (2.2 y 4.4  $\mu\text{M}$ ) en *Neoglaziovia variegata* (Silveira *et al.*, 2009).

Si bien los reguladores de crecimiento ejercen un papel determinante en los procesos de regeneración de bromelias, la concentración de sales en el medio de cultivo también es importante. En *Vriesea friburgensis* Mez, *V. hieroglyphica* y *V. unilateralis* Mez se encontró que los pesos de materia fresca y seca fueron significativamente mayor comparados con el testigo y con mayor número de brotes, cuando se modificó la concentración de calcio, magnesio, azufre, hierro, cobre y cloro del medio MS (Aranda-Peres *et al.*, 2009).

Para *Alcantarea imperialis* 90 mM de nitrógeno en el medio de cultivo generó 25 hojas por plántula (Kurita y Tamaki, 2014). En el caso de *Ananas comosus* se encontró la multiplicación *in vitro* con 30 mM de nitrógeno con un rendimiento de 3% y cada plántulas generó de una a dos yemas (Silva *et al.*, 2017).

### 5.3.3 Alargamiento de brotes

Los medios de cultivo adicionados con 1.4, 2.8 y 5.7  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  afectaron significativamente la longitud del brote ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 3). La mejor respuesta de crecimiento de brotes se obtuvo con 5.7  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  con 1.5 cm. Sin embargo, en las concentraciones con 1.4 y 2.8,  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  también hubo crecimiento (1.3 cm). Dicho crecimiento se observó en todos los brotes durante las ocho semanas de cultivo (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Longitud del brote (BE) y número de brotes (BE) obtenidos en plántulas *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* con ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ) a las ocho semanas de cultivo.**

$\text{AG}_3$ ( $\mu\text{M}$ )	Longitud del brote (cm)	Número de brotes (Núm.)
0	1.1 c	18.8 a
1.4	1.3 b	15.7 b
2.8	1.3 b	14.0 b
4.3	1.1 c	14.2 b
5.7	1.5 a	14.8 b

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Al igual que lo encontrado en *Tillandsia viridiflora*, en otras investigaciones con cultivo *in vitro* de bromelias se ha reportado el crecimiento lento como es el caso de *Vriesea inflata* (Pedroso *et al.*, 2010), *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.*, 2011), *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014), *Acanthostachys strobilacea* (Carvalho *et al.*, 2014) y *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). En contraste, el crecimiento *in vitro* de *A. strobilacea* fue rápido.

En general, se ha reportado que el crecimiento de las bromelias es lento en su hábitat natural y que toma varios años obtener una planta adulta (Vázquez *et al.*, 2014). El crecimiento lento también se observó en este estudio bajo condiciones *in vitro* por lo que resultó importante emplear el ácido giberélico para promover el crecimiento de brotes y plántulas.

El ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) está involucrado en una amplia gama de respuestas del desarrollo vegetal. La respuesta de alargamiento celular se relaciona con la elongación en tallos y hojas de plantas, por lo cual, es usado en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Tolera y Beleu, 2014; Boeri, 2015).

En el cultivo *in vitro* de *Vriesea reitzii* 10 µM de AG<sub>3</sub> fueron óptimos para lograr el alargamiento en todos los brotes del grupos de brotes (Dal Vesco y Guerra, 2010). Similares efectos se encontraron con la misma especie de bromelia con 10 µM de AG<sub>3</sub> junto con 2 µM de AIA (Dal Vesco *et al.*, 2014). Por otra parte, en la bromelia *Vriesea heliconioides* 1 µM de AG<sub>3</sub> fue eficiente para lograr el alargamiento de brotes con promedio de 7.6 cm (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

#### **5.3.4 Enraizamiento de plántulas**

Los medios de cultivo adicionados con las auxinas ANA y AIB afectaron significativamente el enraizamiento, el número de raíces y la longitud de la raíz ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 4). El mayor porcentaje de enraizamiento (95%) se obtuvo con 2.1 µM de AIB; sin embargo, no hubo diferencia significativa con el testigo (70%). Por otra parte, el mayor número de raíces se encontró con 1.0 µM de ANA con 2.4 raíces por plántula en contraste con 2.1 µM de ANA con 0.3 raíces por brote aunque la mayor longitud se encontró 1.0 y 2.1 µM de AIB con 1.5 cm (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Tillandsia viridiflora* con ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) a las seis semanas de cultivo.**

ANA ( $\mu\text{M}$ )	AIB ( $\mu\text{M}$ )	Enraizamiento (%)	Raíces (Núm.)	Longitud de la raíz (cm)
0	0	70 a	0.8 c	1.2 b
1.0	0	75 a	2.4 a	0.9 c
2.1	0	15 b	0.3 c	0.7 d
0	1.0	85 a	1.5 b	1.5 a
0	2.1	95 a	2.0 ab	1.5 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

El enraizamiento se observó a partir de la segunda semana de cultivo en todos tratamientos; fueron de color blanco claro y morfológicamente uniformes, después de la tercera semana se tornaron de color café oscuro (Figura 12).



**Figura 12. Enraizamiento *in vitro* de plántulas de *Tillandsia viridiflora* con 1.0  $\mu\text{M}$  de ANA después de seis semanas de cultivo.**

El proceso de enraizamiento *in vitro* requiere ajustar el balance hormonal, consiste en disminuir las concentraciones de citocininas y aumentar las de auxinas (Quintero *et al.*, 2003). El ANA y el AIB son reguladores de crecimiento usados normalmente para inducir el enraizamiento de plántulas *in vitro* (Uribe *et al.*, 2012). En bromelias se ha reportado que ambas auxinas favorecen el enraizamiento de plantas, aunque también se ha empleado el AIA como inductor.

Así mismo, en el cultivo *in vitro* de la bromelia *Nidularium procerum* el enraizamiento se indujo con 1.35  $\mu\text{M}$  de ANA en medio semisólido, y como resultado se formó una raíz por plántula y 4% de enraizamiento. Para *Nidularium innocentii* el enraizamiento fue de 70% en medio líquido con 5.4  $\mu\text{M}$  de ANA (Da silva *et al.*, 2012).

En otro cultivo *in vitro* de *N. concentrica* el 100% de enraizamiento se obtuvo con 3  $\mu\text{M}$  de ANA a los 30 días y con 2, 3 y 4  $\mu\text{M}$  de ANA, y 1  $\mu\text{M}$  de AIB a los 60 días. Por otra parte, 3  $\mu\text{M}$  de ANA generó 7.1 raíces por plántula a los 30 días y 3  $\mu\text{M}$  de ANA generó 9.9 raíces por plántula a los 60 días. No se encontró diferencia significativa en la longitud de la raíz en ninguno de los casos (Rodrigues *et al.*, 2013). Para *V. cacuminis* 1.5 y 4.5  $\mu\text{M}$  de ANA indujeron 1.9 raíces por explante después de los 90 días de cultivo (Resende *et al.*, 2016).

Además, en *Ananas comosus* se encontró el 100% de enraizamiento con 5.7, 11.4, y 17.1  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA) y 4.9, 8.8 y 14.7  $\mu\text{M}$  de IBA; la mayor cantidad de raíces se logró con 17.1  $\mu\text{M}$  de AIA y el mayor longitud con 4.9  $\mu\text{M}$  de IBA (Atawia *et al.*, 2016).

En el cultivo *in vitro* de *Vriesea incurvata* se reportó que, al reducir la cantidad de nitrógeno en un 75% en el medio de cultivo y adicionar 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, las plántulas formaron mayor número de raíces (5.9) con longitud promedio de 5.9 cm (Sasamori *et al.*, 2016).

Por último, en el caso de *Vriesea heliconioides* se empleó el medio MS con la mitad de concentración de sales alcanzándose 4.6 raíces por plántula (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

#### 5.4 Aclimatación de plántulas

El tamaño de la plántula solo afectó significativamente la altura final de la plántula y la longitud de la raíz; no tuvo efecto sobre la supervivencia y el número de hojas ( $p \leq 0.05$ ; Apéndice 5). El mayor crecimiento en altura de la plántula (6.9 cm) se obtuvo en plántulas de 6.5 cm con sustrato de turba+perlita (1:1) al igual que la mayor longitud de raíz con 2.8 cm. En todos los tratamientos evaluados la supervivencia fue de 100% y el mayor número de hojas se presentó en plántulas de 6.5 cm con sustrato de corteza de pino después de 12 semanas (Cuadro 10, Figura 13).

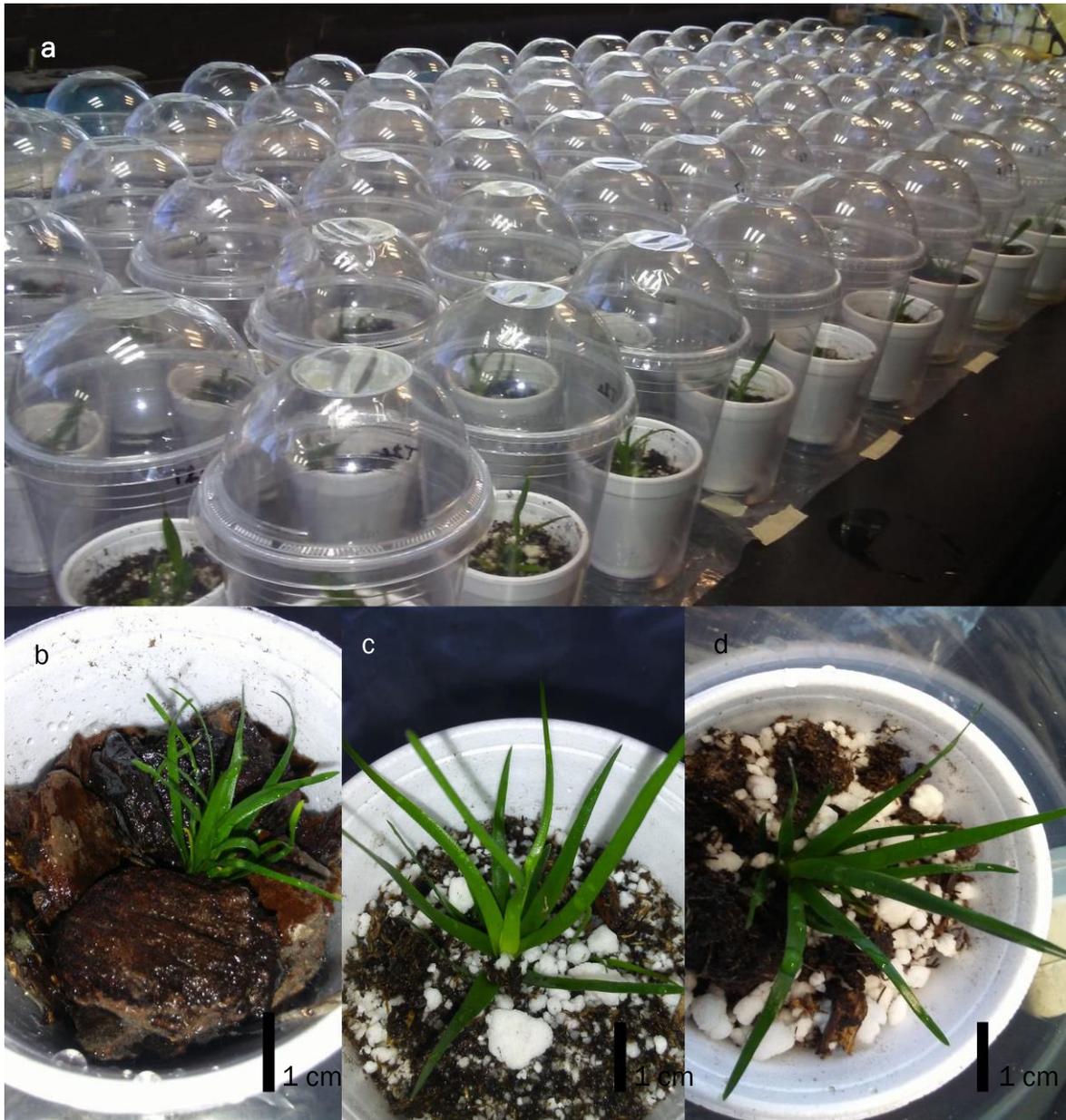
**Cuadro 10. Aclimatación de *Tillandsia viridiflora* en plántulas de 4.5 y 6.5 cm con sustrato de turba+perlita (T+P) y corteza de pino (CP) después de 12 semanas.**

Tamaño de plántula (cm) + Sustrato	Supervivencia (%)	Altura de plántula (cm)	Longitud de raíz (cm)	Hojas (Núm.)
6.5 + CP	100 a	6.7 a	2.7 a	15.2 a
6.5 + T+P	100 a	6.9 a	2.8 a	14.2 a
4.5 + CP	100 a	4.2 b	1.9 b	14.9 a
4.5 + T+P	100 a	4.5 b	2.1 b	13.5 a

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

Los resultados de supervivencia obtenidos en *T. viridiflora* son similares con los reportados en la aclimatación de *Aechmea blanchetiana* y *A. distichantha* donde se obtuvo 90 y 97%, respectivamente, después de 60 días (Santa-Rosa *et al.*, 2013) en sustrato comercial Plantmax® (corteza de pino, carbón, turba y vermiculita). También en *V. reitzii* con 95% de después de 15 semanas en cáscara de arroz carbonizado, corteza de pino y mezcla de comercial Plantmax® (2:2:1 v/v) (Dal Vesco *et al.*, 2014).

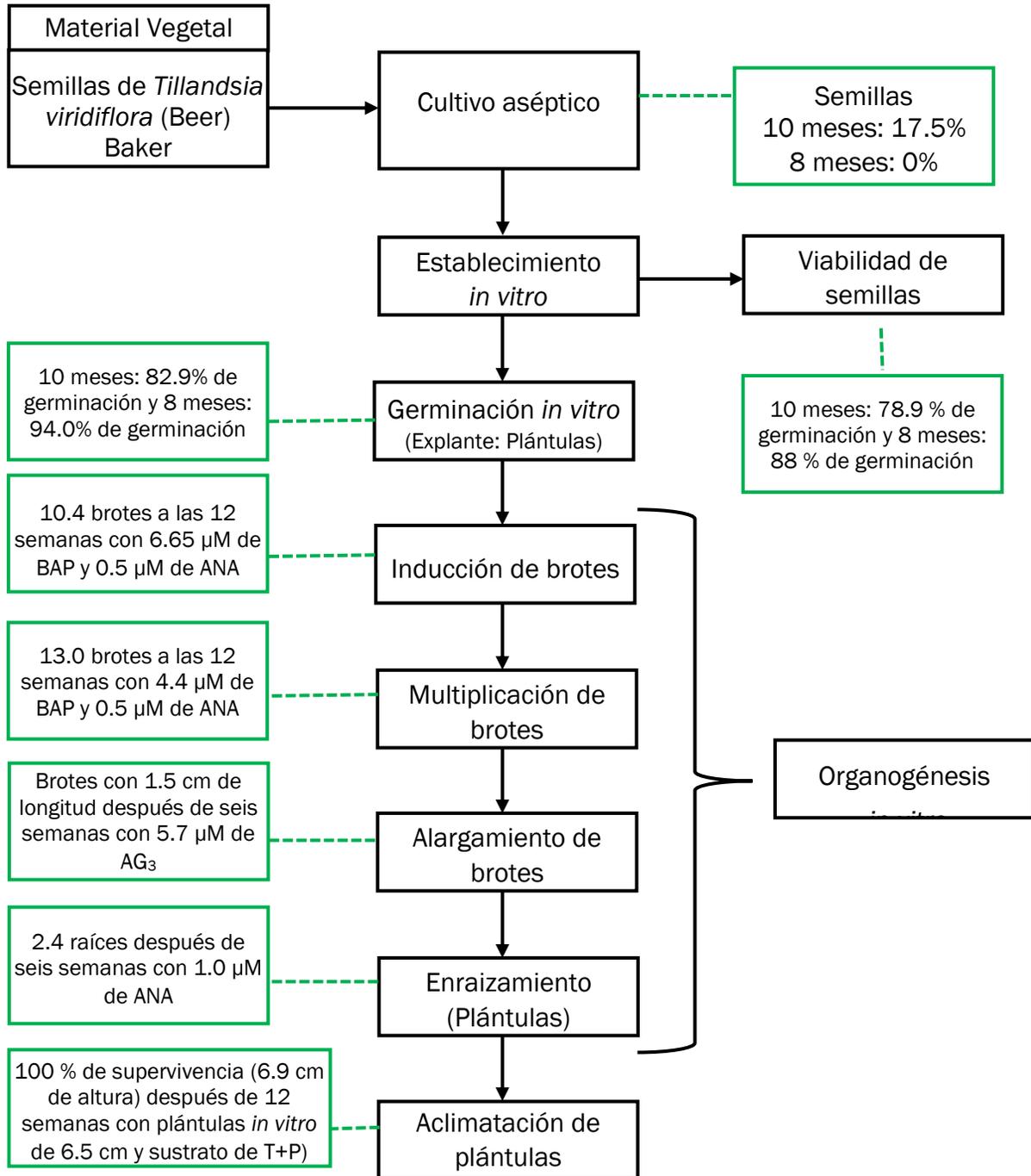
Para *Ananas comosus* se reportó 100% de supervivencia en una mezcla de turba y arena (1:1) (Atawia *et al.*, 2016). En el caso de *V. cacuminis* se alcanzó 90% de supervivencia con sustrato comercial Plantmax Hortaliças HT® (Eucatex Agro, SP) (Resende *et al.*, 2016). Con respecto a la altura inicial de las plántulas para la aclimatación, se ha establecido que en la propagación *in vitro* de bromelias es el factor restrictivo, ya que 3 cm se considera el tamaño mínimo para que sea exitosa (Guerra y Dal Vesco, 2010). En el presente estudio se observó que las dos alturas de plántulas evaluadas (4.5 y 6.5 cm) no afectaron la supervivencia.



**Figura 13. a) Aclimatación de plántulas de *Tillandsia viridiflora* después de una semana. Plantulas de 6.5 cm de altura con: b) sustrato de corteza de pino c) y d) con sustrato de turba+perlita (1:1) después de 12 semanas.**

En resumen, los resultados obtenidos en la presente investigación sobre la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* se indican de manera puntual en un diagrama de flujo donde se combinó la metodología con los resultados en cada una de las etapas abordadas (Figura 14).

### 5.5 Resumen esquemático de resultados



**Figura 14. Diagrama de flujo de resultados de la morfogénesis *in vitro* de *Tillandsia viridiflora*.**

## VI. CONCLUSIONES

- La desinfección de semillas de *Tillandsia viridiflora* fue del 100%.
- La germinación *in vitro* de *T. viridiflora* se obtuvo en el medio MS con 50% de concentración de sales.
- Las semillas de *T. viridiflora* se mantuvieron viables por 38 meses con una germinación promedio de 78.9%.
- La mejor inducción de brotes de *T. viridiflora* se logró con plántulas germinadas *in vitro* de 25 semanas de edad y de 2 cm de altura, como explante, cultivadas con 6.65  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA a las 12 semanas. Se obtuvieron en promedio 10.4 brotes por explante.
- La mayor multiplicación de brotes de *T. viridiflora* se obtuvo con brotes de 0.9 a 1.4 cm y con 4.4  $\mu\text{M}$  de BAP y 0.5  $\mu\text{M}$  de ANA a las 12 semanas. Se lograron 13.0 brotes por explante.
- El alargamiento de brotes de *T. viridiflora* se consiguió con 5.7  $\mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub>. Se obtuvieron brotes con 1.5 cm de longitud.
- El mayor número de raíces *in vitro* (2.4) de *T. viridiflora* se alcanzó con 1.0  $\mu\text{M}$  de ANA en medio MS con 50% de concentración de sales,
- El mejor crecimiento (6.9 cm) de plántulas de *T. viridiflora* en la etapa de aclimatación se adquirió con plántulas enraizadas *in vitro* de 6.5 cm con sustrato de turba+perlita (1:1) después de 12 semanas. Se alcanzó 100 % de supervivencia.
- Con el protocolo de regeneración *in vitro* establecido para *T. viridiflora* es factible obtener en un lapso de 12 meses 135.2 plántulas a partir de una plántula germinada *in vitro* de 25 semanas de edad y de 2 cm de altura como explante.

## VII. RECOMENDACIONES

- Estudiar la germinación (como indicador de viabilidad) en semillas de cinco, seis y siete meses de edad de *T. viridiflora* por uno y dos años.
- Establecer la regeneración *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* por organogénesis indirecta.
- Valorar las hojas de *T. viridiflora* como explante en la ruta morfogénica.
- Determinar el efecto de algunos componentes del medio de cultivo MS con la finalidad de acelerar el crecimiento *in vitro* de *T. viridiflora*.
- Evaluar métodos de corte y selección de brotes útiles para la propagación *in vitro* de *T. viridiflora*, con el fin de disminuir el tiempo de producción.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Rodríguez, P. A., G. M. C. MacSwiney, T. Krömer, J. G. García-Franco, A. Knauer, and M. Kessler. 2014. First record of bat-pollination in the species-rich genus *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 133(6): 1047-1055.
- Alsina, M. B., M. G. Lapa W., e M. A. V. Cruz-Barros, editores. 2006. Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Instituto De Botânica De São Paulo, Brasil. 12 p. [http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Bromelias\\_Bianca\\_Moreira.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Bromelias_Bianca_Moreira.pdf) (Consultado: marzo 2017).
- Andrade, S. V., and V. Tamaki. 2016. *In vitro* growth of *Nidularium minutum* mez (Bromeliaceae) in different concentrations of nitrogen, phosphorus, potassium, and calcium. *Journal of Plant Nutrition* 39(11): 1634-1643.
- Anis, M., and N. Ahmad, 2016. Plant tissue culture: a journey from research to commercialization. *In: Anis, M., and N. Ahmad (eds). Plant Tissue Culture: propagation, conservation and crop improvement.* Springer. Singapore. 621 p.
- Anthura, B. V., y Bureau IMAC Bleiswijk B. V. 2007. Directrices para el cultivo de las bromelias. 11 p. [https://www.academia.edu/4532256/CULTIVO\\_BROMELIAS](https://www.academia.edu/4532256/CULTIVO_BROMELIAS) (Consultado: Marzo 2017).
- Aranda-Peres, A. N., L. E. Pereira P., E. Namita H., A. Pinheiro M. 2009. Adjustment of Mineral Elements in the Culture Medium for the Micropropagation of Three *Vriesea* Bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: The Importance of Calcium. *HortsScience* 44:106-112.
- Atawia, A. R., F. M. Abd EL-Latif, S. F. EL-Giousy, S. S. Sherif and O. M. Kotb. 2016. Studies on Micropropagation of Pineapple (*Ananas comosus* L.). *Middle East Journal of Agriculture* 5: 224-232.
- Boeri, P. 2015. Nutrientes para las plantas de probeta: medios de cultivo-reguladores de crecimiento. *En: Sharry, S., M. Adema, y W. Abedini. (comps). Plantas de Probeta: Manual para la Propagación de Plantas por*

- Cultivo de Tejidos *In Vitro*. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp: 45-72.
- Brandt, F. B., G. O. Martinson, and R. Conrad. 2017. Bromeliad tanks are unique habitats for microbial communities involved in methane turnover. *Plant and Soil* 410: 167-179.
- Cancino-Escalante, G. O., E. Quevedo G., C. Edilia V., y C. Díaz C. 2015. Propagación *in vitro* de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(2): 7-15.
- Calderón-Arias, A. M., A. Restrepo-Gómez, y A. I. Urrea-Trujillo. 2011. Morfogénesis *in vitro* a partir de yemas apicales y bases de hojas de las especies de bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*. *Actual Biol* 33: 17-33.
- Carvalho, V., D. S. Santos, and C. C. Nievola. 2014. *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African Journal of Botany* 92: 39-43.
- Cedres, G. M., y S. Sharry. 2015. Introducción. *En*: Sharry, S., M. Adema, y W. Abedini. (comps). *Plantas de Probeta: Manual para la Propagación de Plantas por Cultivo de Tejidos In Vitro*. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp: 6-12.
- Ceja, J. R., A. Espejo S., A. R. López F., J. García C., A. Mendoza R., y B. Pérez G. 2008. Las plantas epífitas, su diversidad e importancia. *Ciencias* 91: 34-41.
- Chicaiza, L. W. C. 2012. Diversidad y riqueza de bromelias en tres bosques Riparios del cantón Rumiñahui. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador. pp. 54.
- CONABIO, (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2012. *Historias de familias bromelias*. 1ra. ed. CONABIO, México. 28 p.
- CONABIO, (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2013. *La biodiversidad en Chiapas: Estudio de estado*.

- 1ra. ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Gobierno del Estado de Chiapas. México. 431 p.
- Condic, M. L. 2014. Totipotency: What it is and what it is not. *Stem Cells and Development* 23: 796-812.
- CONAP, (Consejo Nacional de Áreas Protegidas). 2010. Guía de reconocimiento de género *Tillandsia* de Guatemala. 1ra. ed. CONAP, Guatemala. 113 p.
- Corazza, K. A. K. , R. Chiapetti , L. Fogaça , A. L. Muller, G. Borguetti, C. Elisiane and E. I. Dall'ólglio C. 2016. Viability of maize pollen grains *in vitro* collected at different times of the day. *African Journal of Agricultural Research* 11: 1040-1047.
- Correa, S., and G. Zots. 2014. The influence of collecting date, temperature and moisture regimes on the germination of epiphytic bromeliads. *Seed Science Research* 24:353–363.
- Corredor-Prado, J. P., E. C. Schmidt, M. P. Guerra, Z. L. Bouzon, L. L. Dal Vesco, and R. Pescador. 2015. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 65: 1-10.
- Criollo, E. H., Insuasti K., y Delgado W. 2016. Regeneración *in vitro* de plántulas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 10: 252-261.
- Cruz, F. P. 2012. Cultivo de tejidos vegetales (manual de prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlan, 39 p. [http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/fondo\\_editorial/comite\\_editorial/manuales/cultivosdetejidosvegetales\\_manualprac.pdf](http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comite_editorial/manuales/cultivosdetejidosvegetales_manualprac.pdf) (Consulta: marzo 2017).
- Da Silva, A. L. L., J. Da Luz A., G. Bomfim A., D. Crystina C., M. Ruzza S., L. A. Biasi, G. Newton S., and C. R. Soccol. 2012. Micropropagation of *nidularium innocentii* lem. And *nidularium procerum* lindm (bromeliaceae). *Pak. J. Bot.* 44: 1095-1101.

- Dal Vesco, L. L., R. Pescador, J. P. Corredor P., L. J. Welter, and M. P. Guerra. 2014. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 36: 271-278.
- Dal Vesco, L. L., and M. P. Guerra. 2010. *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Horticulturae*, 125: 748-755.
- De Castro, V. B., and F. A. O. Silveira. 2010. Reproductive phenology, seed germination and ex situ conservation of *Pseudananas sagenarius* in a semi-deciduous tropical forest fragment. *Plant Species Biology* 25: 214-220.
- Devamani, B., D., M. Saifulla, and Jayappa. 2017. Efficacy of Fungicides and Bioagents on Seed Mycoflora of Mung Bean (*Vigna radiata* L.). *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 5: 231-237.
- Domínguez-Perales, L. A., J. L. Domínguez-Álvarez, S. Cruz-Izquierdo, A. Santacruz-Varela, A. Barrientos-Priego, J. S. Padilla-Ramírez, y M. A. Gutiérrez-Espinosa. 2016. Propagación *in vitro* de selecciones de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 39: 285-295.
- Escobar, E. M. M. 2001. Determinación y caracterización de las enfermedades fungosas y bacterianas asociadas a *Tillandsia* (*Tillandsia* spp.) en la región central de Guatemala, bajo condiciones de producción. Universidad de San Carlos de Guatemala. 34 p. <http://fausac.usac.edu.gt/tesario/tesis/T-01960.pdf> (Consultado: marzo 2017).
- Escobedo, J. S. 2012. Mecanismos de dispersión de semillas en las bromelias. Centro de investigación científica de Yucatán. [https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde\\_Herbario/2012/2012-03-29-Escobedo-Semilla.pdf](https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2012/2012-03-29-Escobedo-Semilla.pdf) (Cunsultado: marzo 2017).
- Espejo-Serna, A., A. R. López-Ferrari, y I. Ramírez-Morillo. 2010. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Familia bromeliaceae. Fascículo 165, INECOL, Michoacán, México. 147 p.

- Fernández Da Silva, R., A. Villarroel, L. Cuamo, y V. Storaci. 2016. Evaluación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de Neem (*Azadirachta indica*). *Acta Biológica Colombiana* 21: 581-592.
- Flores, D. M., R. Chacón C., L. Alvarado M., A. Schmidt D., y C. Alvarado U. 2015. Enraizamiento de vitroplantas de membrillo (*Cydonia oblonga*) por medio de inmersión temporal automatizada y su aclimatación. *Revista Brasileira de Fruticultura* 37(3): 739-747.
- Flores-Palacios, A., A. B. Bustamante-Molina, A. M. Corona-López, and S. Valencia-Díaz. 2015. Seed number, germination and longevity in wild dry forest *Tillandsia* species of horticultural value. *Scientia Horticulturae* 187: 72-79.
- FWCBS, (Florida West Coast Bromeliad Society). 2016. April 2016 Newsletter. Florida. 8 p. <http://fcbs.org/newsletters/FWCBS/042016.pdf> (Consultado: marzo 2017).
- França, E. S., e J. L. Araújo F. 2013. Cultivo de bromélia. BRT. Brasil. 15 p.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50(1): 151-158.
- Gamborg, O. L., and L. R. Wetter. 1975. Plant tissue culture methods. National Research Council of Canada (NRC), Ottawa, Canada. 22 p.
- García, D. L. L., M. L. Ocampo G. y N. Mesa L. 2015. Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 17(2): 76-84.
- García-Suarez, M. D., V. Rico-Gray, N. Molina-Aceves, and H. Serrano. 2006. *In-Vitro* Germination and Clonal Propagation of Endemic *Tillandsia califanii* Rauh (Bromeliaceae). *Selbyana* 27 54-59.
- George, E. F. 2008. Plant tissue culture procedure-background. *In*: George, E. F., M. A. Hall, and G. J. Klerk. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ra. ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. pp. 1-28.

- Guerra M. P. and L. L. Dal Vesco. 2010. Strategies for the micropropagation of bromeliads. *In: Protocols for in vitro propagation of ornamental plants.* S. M. Jain and S. J. Ochatt (eds.). *Methods in Molecular Biology* 589. Humana Press. New York. pp 47-66.
- Hernández-Meneses, E., S. E. Rangel-Estrada, M. C. G. López-Peralta, A. Guerrero-Hilario, G. Ortiz-Gil, y L. Martínez-Bolaños. 2018. Germinación, Viabilidad y Regeneración *in vitro* de Plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. *Rev. Fitotec. Mex.* 41: 99 - 106.
- Iliev, I., A. Gajdosová, G. Libiaková, and S. M. Jain. 2010. Plant micropropagation. *In: Davey, M., R., y P. Anthony.* (ed). *Plant Cell Culture: Essential Methods.* J. Wiley, Chennai, India. pp 1-20.
- Knudson, L. 1946. A nutrient for germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 15:214-217.
- Koh, Y. C., and F. T. Davies Jr. 2001. Mutagenesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). *Scientia Horticulturae* 87: 225-240.
- Kumar, N., and M. P. Reddy. 2011. *In vitro* plant propagation: a review. *Journal of Forest and Environmental Science* 27: 61-72.
- Kurita, F. M. K., and V. Tamaki. 2014. *In vitro* growth of the bromeliad *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms with different concentrations of nitrogen. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 36: 279-285.
- Lavor, P., C. van den Berg, C. M. Jacobi, F. F. Carmo, and L. M. Versieux. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *American Journal of Botany* 101: 1167-1175.
- Linsmaier, E. M., and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.
- Mahmood, I., and A. Razzaq. 2017. Responses of explant type of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes to different tissue culture media. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 45: 265-271.

- Males, J. 2016. Think tank: water relation of Bromeliaceae in their evolutionary context. *Bot. J. Linn. Soc.* 181: 415-440.
- Manfio, C. E., S. Y. Motoike, C. C. de Paula, M. S. Valente, and C. G. Melo. 2010. Early selection of elite clones of an ornamental bromeliad *in vitro*. *Ciência Rural* 40(7): 1537-1544.
- Martínez-Meléndez, N., R. Martínez-Camilo, M. A. Pérez-Farrera, y J. Martínez-Meléndez. 2011. Las epífitas de la reserva El Triunfo, Chiapas. 1ra. ed. UNICACH. Chiapas, México. 208 p.
- Matiz, A, M. P. Tomaso, A. Yepes M., L. Freschi, and H. Mercier. 2013. CAM Photosynthesis in Bromeliads and Agaves: What Can We Learn from These Plants? In: Dubinsky Z. (ed). *Photosynthesis*. InTech, Rijeka. pp 91-134.
- Méndez, E. G., D. Mondragón, G. I. Cruz R., y A. Vázquez Luis. 2011. Usos de las bromelias en el estado de Oaxaca. Primera edición. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca, Mexico. 55 p.
- Miranda, M. E. J., J. J. Arellano M., B. Z. Salazar A., F. Hernández M., R. Quero C., y L. Pérez S. 2007. Bases para el manejo comunitario de bromelias ornamentales. Gaia. Oaxaca, México. 98 p.
- Missagia, C. C. C., and M. A. S. Alves. 2015. The rate of visitation by *Amazilia fimbriata* (Apodiformes: Trochilidae) influences seed production in *Tillandsia stricta* (Bromeliaceae) *ZOOLOGIA* 32: 260–262.
- Molina-Luna, N. G., Y. Arellanes C., y E. Martínez O. 2015. El papel de la comercialización orquídeas y bromelias de mercados de los valles centrales de Oaxaca, México, en la subsistencia campesina. *Revista Observatorio de la Economía Latinoamericana*, México. <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/2015/orquideas.html> (Cunsultado: Marzo 2017).
- Mollo, L., M. C. M. Martins, V. F. Oliveira, C. C. Nievola, and R. de C. L. Figueiredo-Ribeiro. 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: 141-149.

- Mondragón, D. M. C. 2008. La comercialización navideña de bromelias epífitas en la ciudad de Oaxaca, Mexico. *Etnobiología* 6: 24-28.
- Mondragón, D. M. C. Fernández, y E. Méndez. 2009. El cultivo rústico de las bromelias epífitas. Instituto Politécnico Nacional CIIDIR, Oaxaca, México. pp. 28.
- Mondragón, D. M. C., I. M. Ramírez M., M. Flores C., y J. G. Gracia F. 2011. La Familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 103 p.
- Morel, G. M., and Wetmore, R. H. 1951. Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany*, 38:41-143, 951.
- Mroginski, L., P. Sansberro, y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski. (eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio, Argentina. pp: 17-46.*
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Naranjo, E. J., O. Fernandez B., A. I. Urrea T., R. Callejas P., and L. Atehortúa G. 2015. Effect of genotype on the *in vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* via somatic embryogenesis. *Acta Biológica Colombiana* 21: 87-98.
- Negrelle, R. R. B., D. Mitchell, and A. Anacleto. 2012. Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 34: 91-100.
- Nitsch, J. P., and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Nolan, K. E., and R. J. Rose. 2010. Plant regeneration-somatic embryogenesis. *In: Davey, M. R., y P. Anthony. (ed). Plant Cell Culture: Essential Methods. J. Wiley, Chennai, India pp: 39-59.*
- NOM-059-SEMARNAT-2010. Norma Oficial Mexicana. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-

- Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de Especies en Riesgo. [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM\\_059\\_SEMARNAT\\_2010.pdf](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf) (Consulta: febrero 2017).
- Olmos, S., G. Luciani, y E. Galdeano, 2010. Micropropagación. *En*: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski. (eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio, Argentina. pp: 353-362.
- Orozco-Ibarrola, O. A., P. S. Flores-Hernández, E. Victoriano-Romero, A. M. Corona-López, and A. Flores-Palacios. 2015. Are breeding system and florivory associated with the abundance of *Tillandsia* species (Bromeliaceae)?. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 50-65.
- OSRAM, Opto Semiconductors. 2016. Horticulture Lighting with LEDs. OS SSL, Regensburg, Alemania. 41 p.
- Osuna, P. A., y C. Saucedo. 2010. Propagación *in vitro* de vid variedad Globo Rojo. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua, México. 32 p.
- Paggi, G. M., L. C. Tieppo Da Silveira, C. Martini Zanella, M. Bruxel, F. Bered, E. Kaltchuk-Santos, and C. Palma-Silva. 2013. Reproductive system and fitness of *Vriesea friburgensis*, a self-sterile bromeliad species. *Plant Species Biology* 28: 169–176.
- Pech, C. F., B. López C., y E. Pérez S. 2012. Análisis de la distribución del género de *Tillandsia* (Bromeliaceae) en la Península de Yucatán y áreas prioritarias de conservación. *Bioagrobiencias* 5: 5-10.
- Pedroso, A. N. V., R. A. M. Lazarini, V. Tamaki, and C. C. Nievola. 2010. *In vitro* culture at low temperature and ex vitro acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. *Brazilian Journal of Botany* 33(3): 407-414.
- Perea, D. M., y A. Tirado P. 2011. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 158 p.

- Pereira, C., F. Lorena C., e M. Panoblanco. 2010. Germinação e armazenamento de sementes de *Nidularium innocentii* (Lem.). *Revista Brasileira de Sementes* 32: 036-041.
- Pickens, K. A., J. M. Affortel, and H. Y. Wetzstein. 2003. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience* 38: 101-104.
- Pinto, A. C. R., M. E. S. P. Demattê, D. M. M. Santos, J. C. Barbosa, and S. A. Creste. 2013. Growth Regulators for *In Vitro* Propagation of *Tillandsia gardneri* (Bromeliaceae). *Acta Hort.* 1002: 51-57.
- Pinto, A. C. R., M. E. S. P. Demattê, S. Creste, and J. C. Barbosa. 2012. Seed and seedling surface-sterilization for *in vitro* culture of *Tillandsia gardneri* (Bromeliaceae). *Acta Hort.* 961: 383-389.
- Pulido-Rueda, E. E., M. A. Milaneze-Gutierrez and R. Negrelle. 2018. *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae). *Acta Agron.* 67: 140-145.
- Quintero, I., J. Polo, A. Jarma, A. Espitia. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 51-56.
- Ramírez, M. I. 2010. Bromelias. *En: Durán R., y M. Méndez (eds). Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán.* CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA. Mexico. 183-184 p.
- Rangel-Estrada, S. E., E. Hernández-Meneses, y M. G. Hernández-Arenas. 2016. Micropropagación de variedades de caña de azúcar cultivadas en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39: 225-231.
- Reyes, J. Q. 2015. Guía de técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual o vegetativa de las plantas. Santo Domingo, República Dominicana. 64 p. <http://www.competitividad.org.do/wp-content/uploads/2016/05/Guía-de-técnicas-métodos-y-procedimientos-de-reproducción-asexual-o-vegetativa-de-las-plantas.pdf> (Consulta: marzo 2017).
- Resende, C. F., C. Ribeiro, G. Camargo M., C. Q. Godoy S., V. Fernandes B., B. P. Da Cruz, R. Campostrini F., and P. H. Pereira P. 2016. *In vitro*

- culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia, Série Botânica*, Porto Alegre, 71:55-61.
- Rodrigues, J. P. M., M. Pasqual, A. D. Martins, and S. F. Ribeira. 2015. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). *AJCS*. 9:85-91.
- Rodrigues, J. P. M., E. R. Schimildt, R. S. Alexander, B. R. Santos, and G. C. Magevski. 2013. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43: 138-146.
- Rodríguez, M. M. B., M. I. Latsague V., M. A. Chacón F., and P. K. Astorga B. 2014. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque* 35: 111-118.
- Rodríguez, M. U., R. Gómez K., S. J. Martínez, M. Pons C., M. Pérez P., M. La "O" C., and C. Romero Q. 2015. Formation of Somatic Embryos from Immature Seeds of *Sorghum bicolor* Sorghum Variety CIAP 132-R. *Acta Biológica Colombiana* 20: 237-245.
- Ruus, K., and A. Pertuit. 2001. Bromeliads. University of New Hampshire. 5 p.  
[https://extension.unh.edu/resources/files/Resource003995\\_Rep5660.pdf](https://extension.unh.edu/resources/files/Resource003995_Rep5660.pdf). (Consultado: marzo 2017).
- Saad, A. I. M., and A. M. Elshahed. 2012. Plant Tissue Culture Media. *In: Leva, A., and L. M. R. Rinaldi. (eds). Recent Advances in Plant in vitro Culture*. InTech, Winchester. pp: 29-40.
- Santa-Rosa, S., F. V. D. Souza, Á. M. Vidal, C. A. S. Ledo, and J. R. F. de Santana. 2013. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. *Horticultura Brasileira* 31: 112-118.
- SAS, Institute 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute. Cary, NC, USA.

- Sasamori, M. H., D. E. Junior, e A. Droste. 2016. Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. *Rodriguésia* 67(4): 1071-1081.
- Scalzo, J., D. Donno, S. Miller, M. Ghezzi, M. G. Mellano, A. K. Cerutti, and G. L. Beccaro. 2016. Effect of genotype, medium and light on *in vitro* plant proliferation of *Vaccinium* spp. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 44: 231-246.
- Sharma, A., and N. Jain. 2016. Plant growth hormones - the key players in the process of seed germination. *IJRASET*. 4: 334-338.
- Sheu, Y., A. S. Cunha-Machado, A. B. P. L. Gontijo, F. C. Favoreto, T. B. C. Soares, and F. D. Miranda. 2017. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Research* 16: 1-8.
- Silva, P. P. A., F. M. K. Kurita, and V. Tamaki. 2017. Propagação *in vitro* de *Ananas comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & F. Leal (Bromeliaceae). *Científica, Jaboticabal* 45: 313-320.
- Silveira, D. G., F. V. Duarte S., C. Regina P., A. da Silva S., C. A. da Silva L., and J. R. Ferreira S. 2009. Micropropagation and *in Vitro* Conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a Fiber Producing Bromeliad from Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 923-932.
- SNITT, (Sistema Nacional de Investigación y Tránsito Tecnológica para el Desarrollo Rural Sustentable). 2016. *Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología*. México. 197 p.
- Smith, R. 2013. *Plant tissue culture*. 3ra. ed. Elsevier, India. 208 p.
- Solis, R. L., J. Olivera S., y R. S. La Rosa L. 2011. Propagación *in vitro* de *Carica papaya* var. PTM-331 a partir de meristemas apicales. *Revista Peruana de Biología* 18: 343-347.
- Tarré, E., B. B. Mendes P., A. P. Mançano G., L. A. Carneiro, R. C. Forzza., and E. Mansur. 2007. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium Mart. ex Schult. &*

- Schult. f. and *Dyckia Schult.* & Schult. f. species (Bromeliaceae). Acta bot. bras. 21: 777-783.
- Teixeira da Silva, J. A., and M. Tanaka. 2010. Thin cell layers: the technique. *In: Davey, M, R., y P. Anthony.* (eds). Plant Cell Culture: Essential Methods. J. Wiley, Chennai, India pp: 25-37.
- Teshome, S., and T. Feyissa. 2015. *In vitro* callus induction and shoot regeneration from leaf explants of *Glinus lotoides* (L.)-An Important Medicinal Plant. American Journal of Plant Sciences 6: 1329-1340.
- Téllez-Román, J., M. C. G. López-Peralta, E. Hernández-Meneses, A. A. Estrada Luna, H. A. Zavaleta Mancera, and M. Livera Muñoz. 2017. Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8: 86-876.
- The Angiosperm Phylogeny Group, M. W. Chase, M. J. M. Christenhusz, M. F. Fay, J. W. Byng, W. S. Judd, D. E. Soltis, D. J. Mabberley, A. N. Sennikov, P. S. Soltis, and P. F. Stevens. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Bot. J. Linn. Soc. 181: 1-20.
- Tolera, B., M. Diro, and D. Belew. 2014. Effects of Gibberellic Acid and Kinetin on *In Vitro* Aseptic Shoot Tip Culture Establishment of Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) Varieties Grown In Ethiopian Sugar Estates. International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) 16: 496-504.
- Toledo, A., T. 2014. Lluvia de bromelias en el bosque de niebla. CONABIO. Biodiversitas 117: 1-6.
- UNNE, (Universidad de Ciencias del Nordeste). 2010. Monocotiledóneas. 210 p. <http://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/5-%20Monocotiledoneas.pdf> (Consulta: marzo 2018).
- Uribe, M. E., J. Ulloa, C. Delaveau, K. Sáez, F. Muñoz, and P. Cartes. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. Gayana Bot. 69: 105-112.

- Vacca, M. M., M. L. C. Bonomo, Z. Avilés, y L. Díaz. 2014. Inducción de callos embriogénicos y formación de proembriones somáticos en *Pterogyne nitens* Tull “tipa colorada.” *Revista Colombiana de Biotecnología* 16: 194-203.
- Vázquez, N. B. H., J. R. García N., M. Flores C., S. D. Koch O., y A. Robledo P. 2014. Germinación y viabilidad de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* (Bromeliaceae) con fines de aprovechamiento sustentable. *Ciencia y Tecnol. Agrop. México* 2: 30-35.
- Veltcheva, M. R., and D. L. Svetleva. 2005. *In vitro* regeneration of phaseolus vulgaris l. Via organogenesis from petiole explants. *Journal of Central European Agriculture* 6: (53-58).
- Viehmanna, I., P. Hlasna C., J. Vitamvas, P. Streblova, and J. Kisilova. 2016. Micropropagation of a giant ornamental bromeliad *Puya berteroniana* through adventitious shoots and assessment of their genetic stability through ISSR primers and flow cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 125: 293-302.
- Vieira, S. D., A. R. C. Rabbani, F. Santos, R. Silva-Mann, M. F. Arrigoni-Blank, A. P. N. Prata, L. V. Resende, M. Pasqual, and A. F. Blank. 2014. Molecular characterization of bromeliads from northeast Brazil. *Genetics and Molecular Research* 13: 9851-9860.
- Villarreal, B. 2015. ¿Cómo se forman las nuevas plantas *in vitro*?: morfogénesis *in vitro*. Organogénesis. Embriogénesis somática. *En: Sharry, S., M. Adema, y W. Abedini. (comps). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp: 92-101.*
- Wanderley, M. G. L., e S. E. Martins. 2007. Bromeliaceae. *En: Melhem, T. S. A., M. G. L. Wanderley, S. E. Martins, S. L. Jung-Mendaçolli, G. J. Shepherd, e M. Kirizawa. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, FAPESP. São Paulo, Brasil. pp 139-147.*
- White, P. R. 1963. *The cultivation of animal and plant cell*. 2da. ed. Ronal Press, New York. 228 p.

- Yaseen, M., T. Ahmad, G. Sablok, A. Standardi, and I. A. Hafiz. 2013. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports* 40: 2837-2849.
- Ziv, M., and J. Chen. 2008. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. *In*: George, E. F., M. A. Hall., and G. J. Klerk. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3ra. ed. Springer. Dordrecht, the Netherlands. pp. 465-477.
- Zotz, G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes – a critical update. *Bot J Linn Soc.* 171: 453-481.

## IX. APÉNDICE

1. Cuadrados medios y su significancia del análisis de la brotación y número de brotes en la inducción *in vitro* de *T. viridiflora* después de cuatro, ocho y doce semanas de cultivo

Tiempo	Fuente de Variación	Número de brotes	Brotación (%)
4 Semanas	BAP + 0.5 $\mu$ M ANA	28.3*	0.4*
	Error	5.0	0.1
	C. V.	51.8	51.3
	R <sup>2</sup>	0.6	0.4
	Media	4.3	0.6
8 Semanas	BAP + 0.5 $\mu$ M ANA	43.9*	0.4*
	Error	3.2	0.1
	C. V.	39.6	42.7
	R <sup>2</sup>	0.7	0.5
	Media	4.5	0.7
12 Semanas	BAP + 0.5 $\mu$ M ANA	57.0*	0.4*
	Error	2.1	0.0
	C. V.	23.3	28.9
	R <sup>2</sup>	0.8	0.6
	Media	7.0	0.8

\*=Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

2. Cuadrados medios y su significancia del análisis de la brotación y número de brotes en la multiplicación *in vitro* de *T. viridiflora* después de cuatro, ocho y doce semanas de cultivo

Tiempo	Fuente de Variación	Número de brotes	Brotación (%)
8 Semanas	BAP + 0.5 $\mu$ M ANA	36.2*	0.3*
	Error	1.9	0.1
	C. V.	39.5	57.0
	R <sup>2</sup>	0.8	0.3
	Media	3.5	0.7
12 Semanas	BAP + 0.5 $\mu$ M ANA	94.27*	0.42*
	Error	3.75	0.06
	C. V.	24.65	30.08
	R <sup>2</sup>	0.87	0.64
	Media	7.55	0.83

\*=Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

**3. Cuadrados medios y su significancia del análisis de longitud de brote y número de brotes en el alargamiento *in vitro* de *T. viridiflora* después de ocho semanas de cultivo.**

Fuente de Variación	Longitud de brotes (cm)	Brotación (Núm.)
AG3	0.2*	118.1*
Error	0.0	5.2
C. V.	4.6	14.5
R2	0.9	0.8
Media	1.3	15.4

\*=Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

**4. Cuadrados medios y su significancia del análisis de longitud de brote y número de brotes en el alargamiento *in vitro* de *T. viridiflora* después de ocho semanas de cultivo.**

Fuente de Variación	Enraizamiento (%)	Raíces (Núm.)	Longitud de la raíz (cm)
ANA*AIB	0.6*	5.6*	0.5*
Error	0.08	0.3	0.04
C. V.	42.1	44.3	17.3
R2	0.71	0.8	0.8
Media	0.68	1.41	1.2

\*=Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación

**5. Cuadrados medios y su significancia del análisis de supervivencia, altura de la planta, longitud de la raíz y número de hojas en *T. viridiflora* después de 11 semanas de cultivo.**

Fuente de Variación	Supervivencia (%)	Altura de la planta (cm)	Longitud de la raíz (cm)	Número de hojas
ANA*AIB	0	6.1*	1.0*	5.2
Error	0	0.5	0.4	6.9
C. V.	0	12.6	27.7	18.2
R2	0	0.8	0.4	0.2
Media	1	5.6	2.4	14.5

\*=Significativo ( $p \leq 0.05$ ); NS= No significativo; C.V.= Coeficiente de variación