

Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

REGENERACIÓN *in vitro* DE *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther

***In vitro* REGENERATION OF *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther**

Hernández-Meneses, E.; S.E. Rangel-Estrada; J. Canul-Ku y E.J. Barrios-Gómez
REGENERACIÓN *in vitro* DE *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther
In vitro REGENERATION OF *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther



Regeneración *in vitro* de *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther***In vitro* regeneration of *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther**

Hernández-Meneses, E.;
S.E. Rangel-Estrada;
J. Canul-Ku
y E.J. Barrios-Gómez

REGENERACIÓN *in vitro* DE
Tillandsia takizawae Ehlers &
H. Luther

In vitro REGENERATION OF
Tillandsia takizawae Ehlers &
H. Luther

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 57: 171-181. Enero 2024

DOI:
10.18387/polbotanica.57.10

Eleodoro Hernández-Meneses / doromeneses@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2401-4733>

Instituto Tecnológico Superior de la Región Sierra-Tecnológico Nacional de México
Carretera Teapa-Tacotalpa, km 4.5, Francisco Javier Minea, 86801,
Teapa, Tabasco Tel (932)3240650 ext 126

Sandra Eloísa Rangel-Estrada / sandrarangel@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8676-7277>

Jaime Canul-Ku / canulku2001@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0002-9875-0736>

Edwin Javier Barrios-Gómez / barrios.edwin@inifap.gob.mx
<https://orcid.org/0000-0002-1765-5981>

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo
Experimental Zacatepec. Carretera Zacatepec Galeana s/n, Centro, 62780,
Zacatepec de Hidalgo, Morelos. Tel (01) (800) 0882222 ext. 86608

RESUMEN: *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther es una bromelia epífita microendémica de México de inflorescencias vistosas con brácteas de color rosa que contrastan con las flores de color verde. Estos atributos le otorgan potencial como planta ornamental. La conservación de la especie y aprovechamiento comercial requiere de sistemas de propagación eficientes que eviten la extracción de plantas de su hábitat natural. Los objetivos de esta contribución fueron establecer las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas y la regeneración de plantas por organogénesis. Semillas se sembraron en medio de Murashige y Skoog (MS) con la mitad de concentración de sales adicionado con bencil adenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA). Para el alargamiento y enraizamiento de brotes se evaluó el ácido giberélico (AG₃) y el ácido indolbutírico (AIB), respectivamente. En todos los tratamientos se obtuvo una germinación promedio de 97%. La combinación de BA y ANA favorecieron la inducción de brotes en las plántulas recién germinadas. La mayor cantidad de brotes por explante fue de 41.4 con 1 mg L⁻¹ de BA y 0.25 mg L⁻¹ de ANA a las 12 semanas de cultivo. El alargamiento de los brotes se logró en el medio MS completo con 1 mg L⁻¹ de AG₃ después de ocho semanas. La mejor respuesta de enraizamiento fue con 1 mg L⁻¹ de AIB que indujo la formación promedio de 7.7 raíces en todos los brotes a las cuatro semanas. En la aclimatación de plantas la supervivencia fue de 95 % después de cuatro semanas.

Palabras clave: bromelia, endémica, epífita, germinación, organogénesis

ABSTRACT: *Tillandsia takizawae* Ehlers & H. Luther is an epiphytic bromeliad microendemic from Mexico with showy inflorescences with pink bracts that contrast with the green flowers. These attributes give it potential as an ornamental plant. The conservation of the species and commercial use requires efficient propagation systems that avoid the extraction of plants from their natural habitat. The objectives of this contribution were to establish the optimal conditions for *in vitro* seed germination and plant regeneration by organogenesis. Seeds were established in Murashige and Skoog medium (MS) with half the concentration of salts added with benciladenine (BA) and naftalen acetic acid (NAA). In the elongation and rooting of shoots, the gibberellic acid (GA₃) and the indol butic acid (IBA) were evaluated, respectively. In all treatments an average germination of 97% was obtained. The combination of BA and NAA promoted the induction of shoots in recently germinated seedlings. The highest number

of shoots per explant was 41.4 with 1 mg L⁻¹ of BA and 0.25 mg L⁻¹ of NAA after 12 weeks of culture. Shoots elongation was achieved in the complete MS medium with 1 mg L⁻¹ of GA₃ after eight weeks. The best rooting response was with 1 mg L⁻¹ of IBA, which induced the average formation of 7.7 roots in all shoots at four weeks. In the acclimatization of plants the survival was 95 % after four weeks.

Key words: Bromeliad, endemic, epiphyte, seed germination, organogenesis

INTRODUCCIÓN

Las bromelias son plantas monocotiledóneas originarias de las regiones tropicales, subtropicales y templadas del continente americano, con excepción de *Pitcairnia feliciana* que se encuentra en África (Benzing, 2000). El listado más actualizado de bromelias en el mundo incluye 3,408 especies organizadas en 58 géneros y dos notogéneros (Luther, 2014). En México se han reportado 422 especies agrupadas en 19 géneros, de las cuales cerca del 75% presentan endemismo y 172 especies microendémicas (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2018). La riqueza florística de bromelias mexicanas representa 12.4% del total de especies de la familia y se incrementa gradualmente conforme se describen nuevas especies (Hernández-Cárdenas *et al.*, 2020; García-Martínez & Beutelspacher, 2022).

Dentro de la familia, los géneros con mayor diversidad son *Tillandsia*, *Pitcairnia* y *Vriesea*, en conjunto agrupan a más de un tercio (37%) de las especies (Luther, 2014). En México el género *Tillandsia* es el más diverso con 230 especies que representan el 54.5% del total de los registros (Espejo-Serna & López-Ferrari, 2018). La mayoría de las especies son epífitas que prosperan sobre ramas y tallos de árboles de corteza gruesa o sobre rocas.

Las bromelias se pueden usar como forraje, alimento (Hornung-Leoni, 2011), medicamento (Meza-Espinoza *et al.*, 2017), en cercos vivos o artesanal; sin embargo, el uso más destacado es como planta ornamental. En este sentido se pueden usar para la decoración de interiores, jardines, paisajismo o festividades religiosas (Jiménez-López *et al.*, 2019). La belleza única y sorprendente de estas plantas se debe a la morfología de rosetas (tanque), las formas y colores de sus hojas, los colores intensos y formas de sus brácteas florales, así como los colores contrastantes de sus flores. El potencial ornamental de este grupo de plantas se complementa con los períodos de floración prolongados, la resistencia a problemas fitosanitarios y su adaptabilidad a condiciones climáticas extremas. Todos estos atributos las convierten en un recurso fitogenético florícola valioso para las comunidades rurales donde habitan y para la industria ornamental.

Tillandsia takizawae Ehlers & H. Luther es una bromelia microendémica del Valle de Tehuacán, Puebla, México; posee hojas coriáceas de color verde grisáceo e inflorescencias erectas vistosas con brácteas color rosa que contrastan con el verde de las flores (Ehlers, 2000). Estos atributos hortícolas le otorgan potencial ornamental como planta en maceta, aunque normalmente crece como epífita sobre *Stenocereus marginatus*, *Stenocactus weberi*, *Opuntia streptacantha*, *Polaskia chichipe* o *Quercus* sp.

En nuestro país, los ejemplares de esta especie que se comercializan se extraen de sus hábitats naturales, para su uso en festividades religiosas principalmente, y es una práctica ilegal que constituye una seria amenaza para las poblaciones silvestres. Es importante resaltar que muchas de las especies son endémicas y la sobreexplotación de sus poblaciones conduce a la extinción de las especies. La atención de esta problemática es apremiante y se requieren estrategias viables que favorezcan su conservación y aprovechamiento sustentable sin alterar dichas poblaciones silvestres. El desarrollo de sistemas de propagación eficientes es una de esas estrategias. Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se han consolidado como herramientas biotecnológicas útiles para el rescate, conservación y aprovechamiento de especies

amenazadas o en peligro de extinción (Anis & Ahmad, 2016), ya sea vía organogénesis o embriogénesis somática.

En *T. takizawae*, como en muchas otras especies de bromelias mexicanas, no existen reportes sobre su propagación y cultivo, ya sea de forma convencional o *in vitro*, que permitan su conservación y aprovechamiento de forma sustentable. A partir de estos antecedentes, los objetivos de esta contribución fueron definir las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas de *Tillandsia takizawae* y establecer un sistema de regeneración vía organogénesis a partir de las plántulas germinadas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección de semillas

Las cápsulas maduras con semillas se colectaron de ejemplares silvestres (Figura 1a) ubicados en las coordenadas 17° 42' 52" LN y 97° 39' 38" LO en vegetación de bosque tropical caducifolio en el municipio de Huajuapan de León, Oaxaca, México. Las semillas sanas y de tamaño uniforme se lavaron con detergente comercial por 5 min seguido de enjuagues con agua de la llave y agua destilada esterilizada. Enseguida se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®; 30 % v/v) por 15 min en agitación continua y cinco enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se lavaron con Captan (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida, 1.0 g L⁻¹) por 10 min y nuevamente se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada.

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado en la germinación y la organogénesis fue el de Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹), glicina (2 mg L⁻¹), mioinositol (100 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), piridoxina (0.5 mg L⁻¹), tiamina (0.1 mg L⁻¹) y solidificado con agar-agar (Merck®, 9 g L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y se esterilizó en autoclave vertical (FELISA®, modelo FE-405) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión por 20 min. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16 horas e intensidad luminosa de 45 µmol m⁻² s⁻¹.

Establecimiento *in vitro*

Las semillas desinfectadas se establecieron en medio de cultivo MS con 50% de la concentración de sales y concentraciones diferentes de 6-benciladenina (BA; 0, 0.25, 0.5 y 1 mg L⁻¹), sola o en combinación con ácido α-naftalenacético (ANA; 0, 0.1 y 0.25 mg L⁻¹). Se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo. Después de tres semanas se contabilizó la germinación (%). Para promover el crecimiento de los brotes se hizo un subcultivo a las cuatro semanas a medio de cultivo MS completo sin reguladores de crecimiento y a las 12 semanas se registró la brotación (porcentaje de plántulas que generaron brotes) y número brotes por explante. El experimento se condujo en un diseño completamente al azar en arreglo factorial 4x3; cada tratamiento estuvo representado por diez repeticiones y la unidad experimental consistió de un frasco con 20 semillas.

Alargamiento de brotes

Para promover el crecimiento, los brotes de 1.5 cm de longitud se establecieron en el medio MS adicionado con ácido giberélico (AG₃; 0, 0.25 y 0.5 mg L⁻¹). Después de ocho semanas se cuantificó la altura de los brotes (cm). El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento; la unidad experimental fueron cinco brotes por frasco.

Enraizamiento de brotes

Para inducir el enraizamiento, brotes de 3 cm de longitud se establecieron en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ácido indolbutírico (AIB; 0, 0.25, 0.5 y 1 mg L⁻¹). Después de cuatro semanas se cuantificó el enraizamiento (%), número de raíces y altura

de la planta (cm). El diseño experimental fue completamente al azar con diez repeticiones por tratamiento; la unidad experimental fueron tres plantas por frasco.

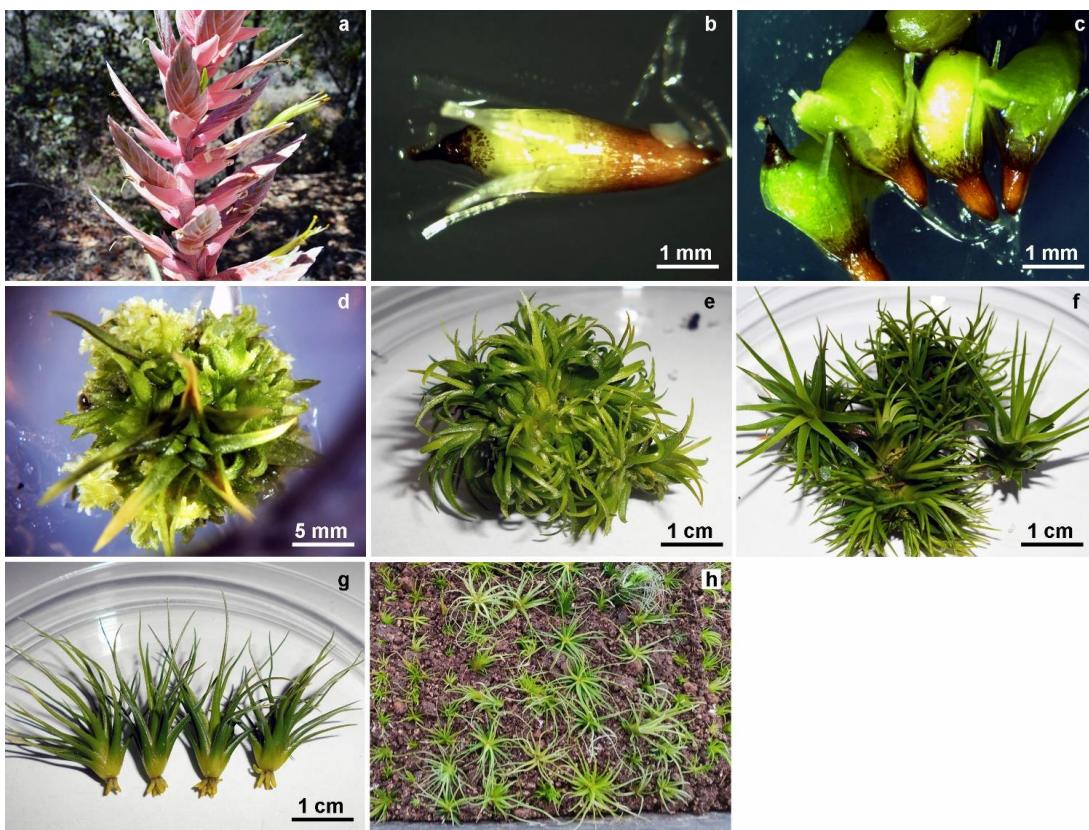


Figura 1. Germinación *in vitro* de *Tillandsia takizawae* y regeneración de plantas por organogénesis directa. a) Inflorescencia; b) Germinación después de una semana de cultivo; c) Plantas con las primeras hojas después de tres semanas de iniciar el cultivo; d) Inducción de brotes a partir de plántulas con 1 mg L^{-1} de BA y 0.25 mg L^{-1} de ANA a las seis semanas; e) Alargamiento de brotes inducidos con 1 mg L^{-1} de BA y 0.25 mg L^{-1} de ANA a las 12 semanas; f) Crecimiento de plantas con 0.5 mg L^{-1} de AG₃ después de ocho semanas; g) Enraizamiento de los brotes en medio MS a la mitad de sales con 1 mg L^{-1} de AIB a las dos semanas; h) Aclimatación de plantas después de cuatro semanas de cultivarse en la mezcla de sustratos.

Figure 1. *In vitro* germination of *Tillandsia takizawae* and plant regeneration through direct organogenesis. a) Inflorescence; b) Germination after one week of cultivation; c) Plants with the first leaves after three weeks of initiating cultivation; d) Shoot induction from seedlings with 1 mg L^{-1} BA and 0.25 mg L^{-1} NAA at six weeks; e) Elongation of induced shoots with 1 mg L^{-1} BA and 0.25 mg L^{-1} NAA at 12 weeks; f) Plant growth with 0.5 mg L^{-1} GA₃ after eight weeks; g) Rooting of shoots in half-strength MS medium with 1 mg L^{-1} IBA at two weeks; h) Acclimatization of plants after four weeks of being cultivated in the substrate mixture.

Aclimatación de plantas

Plantas enraizadas de 4 a 6 cm de altura promedio se colocaron en una mezcla de sustratos a base de turba (peat moss), perlita y corteza de pino (1:1:1). Se utilizaron charolas especiales para la aclimatación de plantas sin cavidades de 50 cm de largo por 30 cm de ancho provistas de un domo protector transparente. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero a 26°C y se regaron cada tercer día con 50% de las sales del medio MS. A las dos semanas los domos se fueron levantando gradualmente para favorecer el intercambio de humedad con el

exterior hasta retirarlo por completo a las cuatro semanas y así contabilizar el porcentaje de supervivencia.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos de establecimiento *in vitro*, alargamiento y enraizamiento se sometieron a análisis de varianza con el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2003) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores de porcentajes se transformaron mediante la raíz cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

Durante el establecimiento *in vitro* de las semillas las respuestas morfogénicas fueron afectadas significativamente por la composición del medio de cultivo. La germinación se presentó en todos los tratamientos evaluados y alcanzó porcentajes entre 95.5 y 99% después de tres semanas. En cambio, los tratamientos con BA y ANA, además de permitir la germinación, favorecieron la organogénesis a partir de las plántulas. En este caso, la citocinina BA fue quien tuvo mayor efecto sobre el porcentaje de formación de brotes adventicios y sobre el número de brotes por explante (Cuadro 1).

La emergencia de la radícula, considerada como el inicio de la germinación, ocurrió después de una semana en todos los tratamientos (Figura 1b) mientras que las primeras hojas se observaron después de la tercera semana (Figura 1c). En las bromeliáceas silvestres las semillas constituyen el método de propagación más efectivo en su hábitat natural comparado con la vegetativa por medio de vástagos (hijuelos). Se ha reportado que normalmente las semillas no enfrentan limitantes para la germinación (Benzing, 2000), no obstante, la limitada cantidad de plántulas que alcanza el estado adulto puede relacionarse con la distribución diferencial de estas epífitas dentro del dosel, ya que algunas no encuentran las condiciones apropiadas para su crecimiento (Winkler *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Germinación *in vitro*, formación de brotes adventicios y número de brotes por explante de *Tillandsia takizawae* con benciladenina (BA) y ácido naftalenacético (ANA).

Table 1. *In vitro* germination, adventitious shoot formation, and number of shoots per explant of *Tillandsia takizawae* with benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA).

BA (mg L ⁻¹)	ANA (mg L ⁻¹)	† Germinación (%)	†† Formación de brotes adventicios (%)	†† Número de brotes por explante
0	0	96.5 a	0 b	0.0 h
0	0.1	97.0 a	0 b	0.0 h
0	0.25	98.0 a	0 b	0.0 h
0.5	0	99.0 a	100 a	3.8 g
0.5	0.1	96.0 a	100 a	8.1 ef
0.5	0.25	97.0 a	100 a	12.2 c
1	0	98.0 a	100 a	10.9 d
1	0.1	98.5 a	100 a	25.6 b
1	0.25	95.5 a	100 a	41.4 a
2	0	95.5 a	100 a	6.9 f
2	0.1	98.0 a	100 a	8.7 e
2	0.25	99.0 a	100 a	12.9 c
DMSH		0.8	0	1.2

† Datos obtenidos a las tres semanas; †† datos obtenidos a las 12 semanas. Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMSH = diferencia mínima significativa honesta.

† Data obtained at three weeks; †† data obtained at 12 weeks. Means with the same letters within each column are not statistically different (Tukey, 0.05). DMSH = honest significant difference.

En la germinación *in vitro* de bromelias los mejores resultados se han obtenido con el medio MS, ya sea con el 100% o con la mitad de la concentración de sales (Guerra & Dal Vesco, 2010), aunque también se ha reportado el medio Knudson C y sus modificaciones (Pickens *et al.*, 2003). En *Vriesea heliconioides* el 98% de germinación promedio se obtuvo en el medio MS (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). En cambio, las semillas de *V. gigantea* y *V. philippocburgii* germinaron en las sales completas del medio MS, pero las plántulas no continuaron su crecimiento después de algunas semanas (Droste *et al.*, 2005).

El éxito en la germinación *in vitro* promedio de 97% en *T. takizawae* podría estar relacionada con la edad de las semillas, ya que se colectaron de cápsulas que tenían entre 15 días y un mes de haber iniciado su dehiscencia. A reserva de más estudios sobre la viabilidad de semillas almacenadas en *T. takizawae*, en especies del género *Tillandsia* se ha reportado que la germinación se puede mantener por más de un año, pero ésta se reduce gradualmente. En *T. caput-medusae* 81.7% de las semillas germinaron después de un año de almacenamiento a 25 °C, mientras que en *T. recurvata* sólo 8 % (Flores-Palacios *et al.*, 2015). En cambio, en el caso de *Vriesea heliconioides* se reportó 98% de germinación después de un año y 72% después de dos años (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

En la literatura no existen reportes sobre la germinación de semillas de *Tillandsia takizawae* en su hábitat natural; pero por ser una epífita, el crecimiento de las plántulas está condicionado a que las semillas germinen sobre la corteza de tallos o ramas de árboles y que encuentren las condiciones ambientales apropiadas para crecer; las semillas que se caen al suelo pueden germinar pero no pueden continuar con su desarrollo. En condiciones naturales se ha reportado que los bajos porcentajes de germinación de bromelias epífitas se deben a factores como el clima y sustrato, y ello puede limitar la capacidad de las especies para colonizar hábitats perturbados y la distribución dentro del dosel (Hietz *et al.*, 2012).

Organogénesis a partir de plántulas germinadas *in vitro*

Las concentraciones de 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹ de BA combinadas con 0.1 y 0.25 mg L⁻¹ de ANA promovieron la organogénesis en 100% de las plántulas recién germinadas. Debido al crecimiento lento de la especie, fue necesario hacer un subcultivo a medio MS libre de reguladores de crecimiento a las cuatro semanas para después contabilizar el número de brotes a las 12 semanas de la siembra *in vitro*. De este modo, la mejor respuesta, considerada como la mayor cantidad de brotes, fue favorecida por la combinación de 1 mg L⁻¹ de BA y 0.25 mg L⁻¹ de ANA que produjo 41.4 brotes por plántula (Cuadro 1), (Figura 1d-e). Esta respuesta superó por más del triple la mayor cantidad de brotes obtenidos con 0.5 y 2 mg L⁻¹ de BA combinadas con 0.25 mg L⁻¹ de ANA, que fueron 12.2 y 12.9 brotes por explantes, respectivamente.

El efecto inductor de la BA y ANA en la organogénesis de *T. takizawae* se ha reportado en la propagación *in vitro* de otras especies de bromelias mexicanas utilizando como explantes plántulas germinadas *in vitro*. Si bien los reportes son escasos, en *Tillandsia eizii*, endémica de México, la combinación de 2 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de ANA en medio MS promovió la formación de yemas adventicias en 40% de plántulas de 12 semanas de edad empleadas como explantes (Pickens *et al.*, 2006). En la organogénesis de *Tillandsia viridiflora* se indujeron 10.4 brotes por explante con 1.5 mg L⁻¹ de BA y 0.01 mg L⁻¹ de ANA en medio MS después de 12 semanas de cultivo (Márquez-Martínez *et al.*, 2020). En el caso de *V. heliconioides*, la inducción de 6.8 brotes por explante fue posible con 2.25 mg L⁻¹ de BA y 0.2 mg L⁻¹ de ANA en medio MS después de 12 semanas de cultivo (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

En otras especies como *V. gigantea* el medio MS con 2.0 mg L⁻¹ de BA y 0.5 mg L⁻¹ de ANA indujo 3.1 brotes por explante después de 16 semanas de cultivo a partir de plántulas *in vitro*; mientras que en *V. philippocoburgii* en el mejor tratamiento se obtuvieron 5 brotes por explante con estas mismas concentraciones de BA y ANA pero en el medio Knudson (Droste *et al.*, 2005). La variación en las respuestas *in vitro*, entendida como la cantidad de brotes generados por explante, entre las especies de bromeliáceas reportadas, indica que el genotipo tiene una fuerte influencia sobre la capacidad morfogénica. Por ello es muy importante desarrollar protocolos de propagación *in vitro* específicos para cada especie de bromelia.

Con los resultados obtenidos en la organogénesis de *T. takizawae* se abre la posibilidad de producir mayor cantidad de plantas y representa una ventaja sobre la germinación. El establecimiento *in vitro* de semillas en medio MS sin reguladores de crecimiento con la mitad de concentración de sales favorece la germinación, pero solo se puede generar una plántula.

Alargamiento de los brotes

Los tres tratamientos evaluados favorecieron el alargamiento de los brotes, pero la respuesta fue mejor con las concentraciones de 0.25 y 0.5 mg L⁻¹ de AG₃ en comparación con el medio sin reguladores de crecimiento. La mayor longitud promedio de brotes fue de 6.8 cm con 0.5 mg L⁻¹ de AG₃, seguido de 3.8 cm con 0.25 mg L⁻¹ de AG₃; en el medio sin reguladores la altura fue de 3.3 cm (Figura 1f). El crecimiento de las bromelias se caracteriza por ser perenne en su ambiente natural, con raíces cortas, y está en función del suministro de agua, nutrientes y calidad de luz (Laube & Zottz, 2003). En *T. takizawae* este crecimiento también se observó durante el cultivo *in vitro*, aunque la fuente de carbono, los nutrientes y los reguladores de crecimiento aportados por el medio de cultivo favorecieron el desarrollo. En esta especie no se conoce con exactitud el tiempo estimado para que alcancen su floración, pero es probable que pueden tardar años.

En bromelias se ha reportado que el AG₃ promueve el alargamiento de las plantas; no obstante, la efectividad de la giberelina dependerá de la especie y la dosis empleada. El alargamiento de los brotes de *Vriesea friburgensis* (Alves & Guerra, 2001) y *Dyckia distachya* (Pompelli & Guerra, 2005) fue promovido con 1.7 mg L⁻¹ de AG₃; mientras que en *V. reitzii* los brotes crecieron mejor con 3.4 mg L⁻¹ (Dal Vesco & Guerra, 2010).

Enraizamiento de brotes

El enraizamiento se presentó en todos los tratamientos evaluados y fue mejor en los medios con AIB. El número mayor de raíces y mayor altura de planta se indujeron con 1 mg L⁻¹ de AIB con promedio de 7.7 raíces por planta y 6.2 cm, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Enraizamiento de los brotes de *Tillandsia takizawae* regenerados *in vitro* en presencia de ácido indolbutírico (AIB), después de cuatro semanas de cultivo.

Table 1. In vitro germination, adventitious shoot formation, and number of shoots per explant of *Tillandsia takizawae* with benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid.

AIB (mg L ⁻¹)	Enraizamiento (%)	Número de raíces	Altura de planta (cm)
0	100	a	2.2
0.25	100	a	4.0
0.5	100	a	6.8
1	100	a	7.7
DMSH	0	0.7	0.7

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

DMSH = diferencia mínima significativa honesta.

El enraizamiento se observó a partir de la segunda semana de cultivo en todos los tratamientos (Figura 1g); las raíces fueron de color amarillo claro y después de la cuarta semana se tornaron de color café. Generalmente, la fase de enraizamiento en el cultivo *in vitro* se induce al reducir las concentraciones de citocininas y aumentar las de auxinas (Anis & Ahmad, 2016). El AIB es una de las auxinas sintéticas usadas para inducir el enraizamiento de brotes regenerados *in vitro* (Phillips & Garda, 2019) y en *T. takizawae* resultó eficiente después de cuatro semanas de cultivo.

En las bromelias epífitas la función principal de las raíces es brindar anclaje a la planta ya que la absorción de agua y nutrientes es llevada a cabo por los tricomas que se ubican en las hojas, como sucede en las especies del género *Tillandsia* (Mondragón *et al.*, 2011). Con respecto a la altura de las plantas *in vitro* de bromelias se ha reportado que es uno de los factores limitantes previo a la etapa de aclimatación, ya que plantas menores de 3 cm comprometen la tasa de supervivencia (Guerra & Dal Vesco, 2010).

Aclimatación de plantas

La supervivencia de las plantas de *T. takizawae* cultivadas en la mezcla de turba, perlita y corteza de pino fue de 95% (Figura 1h). En la aclimatación de bromelias se pueden emplear diferentes sustratos con resultados óptimos como mezclas de corteza de pino (*Pinus L.*), cáscara de arroz carbonizada, vermiculita, turba, arena o fibra de coco (Dal Vesco y Guerra, 2010; De Resende *et al.*, 2016; Hernández-Meneses *et al.*, 2018). Después de esta fase se deben aplicar prácticas de manejo agronómico, en condiciones de invernadero o bajo malla sombra, que garantice el crecimiento de las plantas para que puedan sobrevivir a las condiciones definitivas o para los fines a los que se destinan.

CONCLUSIONES

La germinación *in vitro* de semillas de *Tillandsia takizawae* y la organogénesis a partir de plántulas pueden solventar las restricciones de bajas tasas de germinación y mortalidad de plantas en condiciones naturales. Los resultados de este estudio abren la posibilidad de propagar gran cantidad plantas como una estrategia más que ayude a la protección de la especie, la recuperación de poblaciones silvestres y su eventual aprovechamiento sustentable con fines comerciales. Este protocolo de propagación *in vitro* a partir de semillas permite mantener la variabilidad genética de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Campo Experimental Zacatepec del INIFAP, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo el estudio en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos e invernadero.

LITERATURA CITADA

Alves, G. M., & Guerra, M. P. (2001). Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society*, 51(5), 202-212.

Anis, M., & Ahmad, N. (2016). Plant tissue culture: a journey from research to commercialization. En M. Anis, & N. Ahmad, *Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement* (págs. 3-13). Singapore: Springer Science+Business Media.

Benzing, D. H. (2000). *Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.

Dal Vesco, L. L., & Guerra, M. P. (2010). *In vitro* morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. *Scientia Horticulturae*, 125(4), 748-755. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.030>

De Resende, C., Ribeiro, C., Mendes, G. C., Soares, C. G., Braga, V., da Cruz, B. P., . . . Peixoto, P. H. (2017). *In vitro* culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia, Série Botânica*, 71(1), 55-61. doi:<https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/488>

Droste, A., Silva, A. M., Matos, A. V., & Almeida, J. W. (2005). *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of biology and Technology*, 48, 717-722. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000600006>

Ehlers, R. (2000). A new *Tillandsia* from southern Mexico. *Journal of the Bromeliad Society*, 50, 216-221.

Espejo-Serna, A., & López-Ferrari, O. R. (2018). La familia Bromeliaceae en México. *Botanical Sciences*, 96(3), 533-554. doi:<https://doi.org/10.17129/botsci.1918>

Flores-Palacios, A., Bustamante-Molina, A. B., Corona-López, A. M., & Valencia-Díaz, S. (2015). Número de semillas, germinación y longevidad en especies de *Tillandsia* silvestres de bosque seco de valor hortícola. *Scientia Horticulturae*, 187, 72-79. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.003>

García-Martínez, R., & Beutelspacher, C. R. (2022). A new stoloniferous species of *Catopsis* (Bromeliaceae) from Chiapas, Mexico. *Journal of the Bromeliad Society*, 72(3), 119-127.

Guerra, M. P., & Dal Vesco, L. L. (2010). Strategies for the micropropagation of bromeliads. En S. M. Jain, & S. J. Ochatt, *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Methods in Molecular Biology* (págs. 47-66). New York, USA: Humana Press-Springer. doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_6

Hernández-Cárdenas, R. A., Espejo-Serna, A., López-Ferrari, A. R., & Lara-Godínez, S. A. (2020). *Tillandsia dichromantha* (Tillandsioideae; Bromeliaceae), a new species from the state of Oaxaca, Mexico. *Phytotaxa*, 447(2), 81-87. doi:<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.447.2.1>

Hernández-Meneses, E., Rangel-Estrada, S. E., López-Peralta, M. C., Guerrero-Hilario, A., Ortiz-Gil, G., & Martínez-Bolaños, L. (2018). Germinación, viabilidad y regeneración *in vitro* de plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. Ex Walp. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(2), 99-106. doi:<https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.99-106>

Hietz, P., Winkler, M., Scheffknecht, S., & Hülber, K. (2012). Germination of epiphytic bromeliads in forests and coffee plantations: microclimate and substrate effects. *Biotropica*, 44(2), 219-229. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2011.00791.x>

Hornung-Leoni, C. T. (2011). Bromeliads: traditional plant food in Latin America since prehispanic times. *Polibotánica*, 32, 219-229.

Jiménez-López, D. A., Solórzano, J. V., Vibrans, H., Espejo-Serna, A., & Peralta-Carreta, C. (2019). Ceremonial use of bromeliads and other vascular epiphytes in cemeteries of two indigenous communities of Las Margaritas, Chiapas, Mexico. *Economic Botany*, 73(1), 127-132. doi:<https://doi.org/10.1007/s12231-019-09445-4>

Laube, S., & Zott, G. (2003). Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology*, 17(5), 598-604. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00760.x>

Luther, H. E. (2014). *An alphabetic list of bromeliad binomials*. Florida, USA: The Marie Selby Botanical Gardens and The Bromeliad Society International.

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

Meza-Espinoza, L., García-Magaña, M. L., Vivar-Vera, M. A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Chacón-López, A., Becerra-Verdín, E. M., . . . Montalvo-González, E. (2017). Aspectos etnobotánicos, nutricionales y actividad biológica de extractos de frutos del género *Bromelia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(4), 425-437.

Recibido:
5/septiembre/2023

Aceptado:
15/enero/2024

Mondragón-Chaparro, D. M., Ramírez-Morillo, I. M., Flores-Cruz, M., & García-Franco, J. G. (2011). *La familia Bromeliaceae en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-493.

Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 242-257. doi:<https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>

Pickens, K. A., Affolter, J. M., Wetzstein, H. Y., & Wolf, J. H. (2003). Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience*, 38(1), 101-104. doi:<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.1.101>

Pickens, K. A., Wolf, J., Affolter, J. M., & Wetzsteinet, H. Y. (2006). Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42, 348-353. doi:<https://doi.org/10.1079/IVP2006779>

Pompelli, M. F., & Guerra, M. P. (2005). Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5(1), 117-126.

SAS Institute Inc . (2003). *The SAS system for windows. Release 9.1*. Cary, N.C., U.S.A.

Winkler, M., Huelber, K., & Hietz, P. (2005). Effect of canopy position on germination and seedling survival of epiphytic bromeliads in a Mexican humid montane forest. *Annals of Botany*, 95(6), 1039-1047. doi:<https://doi.org/10.1093/aob/mci115>