



## GERMINACIÓN, VIABILIDAD Y REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp.

### *In vitro* GERMINATION, VIABILITY AND REGENERATION OF *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. PLANTS

Eleodoro Hernández-Meneses<sup>1</sup>, Sandra E. Rangel-Estrada<sup>2\*</sup>, Ma. Cristina G. López-Peralta<sup>3</sup>, Arturo Guerrero-Hilario<sup>4</sup>, Gonzalo Ortiz-Gil<sup>4</sup> y Luciano Martínez-Bolaños<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad (PREGEP) - Fisiología Vegetal, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carr. Federal México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>2</sup>Campo Experimental Zacatepec, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carr. Zacatepec-Galeana s/n. 62780, Centro, Zacatepec de Hidalgo, Morelos. Tel (01) (800) 0882222 Ext. 86608. <sup>3</sup>PREGEP - Genética, Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carretera Federal México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México. <sup>4</sup>Unidad Regional Universitaria Sur Sureste, Universidad Autónoma Chapingo, km 7 Carretera Teapa-Vicente Guerrero. 86800, Teapa, Tabasco.

\*Autor para correspondencia (sandrangel@hotmail.com)

#### RESUMEN

*Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp es una bromelia que posee inflorescencias de brácteas rojas y pétalos blancos que le otorgan amplio potencial hortícola. Para su aprovechamiento comercial es necesario desarrollar protocolos de propagación eficientes que desalienten la extracción de su hábitat natural. Los objetivos del presente estudio fueron definir las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas, determinar su viabilidad y regenerar plantas por organogénesis. Las semillas se sembraron en el medio de Murashige y Skoog (MS) completo o a la mitad de su concentración de sales para evaluar la germinación. Otras semillas se conservaron durante dos años a 10 °C o a temperatura ambiente para estimar su viabilidad. Para inducir la organogénesis, plántulas obtenidas *in vitro* se cultivaron en el medio MS suplementado con distintas concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP, 5-15 µM) y ácido α-naftalenacético (ANA, 1 y 2 µM). Se alcanzó una germinación de 100 % de las semillas en el medio MS a la mitad de concentración de sales. La viabilidad de las semillas se puede mantener hasta por dos años conservándolas a 10 °C, aunque ésta se reduce gradualmente hasta llegar a 86 % después de este tiempo. La organogénesis se observó en el medio MS adicionado con 10 µM de BAP y 1 µM de ANA, en el que se formaron 6.8 brotes por explante después de 12 semanas. La multiplicación de los brotes se obtuvo en las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento usadas en la etapa de inducción. El alargamiento y enraizamiento de plantas se logró en el medio MS a la mitad de concentración de sales suplementado con 1 µM de ácido giberélico. La aclimatación de las plantas fue eficiente en fibra de coco y corteza con tasas de supervivencia de 95 y 93 %, respectivamente.

**Palabras clave:** *Vriesea heliconioides*, bromeliad, cultivo de tejidos, micropropagación, organogénesis, viabilidad.

#### SUMMARY

*Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp is a bromeliad that possesses inflorescences of red bracts and white petals that confer it great horticultural potential. For commercial purposes, it is necessary to develop efficient propagation protocols that discourage the extraction from its natural habitat. This study aimed to define the optimal conditions for *in vitro* germination of seeds, to determine their viability and to regenerate plants via organogenesis. Seeds were sowed on Murashige and Skoog (MS) medium either complete or at half

of its salts concentration to evaluate germination. Other seeds were stored for two years at 10 °C or at room temperature to estimate viability. To induce organogenesis, seedlings obtained *in vitro* were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP, 5-15 µM) and α-naphthaleneacetic acid (NAA, 1-2 µM). A germination of 100 % of the seeds was achieved on the MS medium at half the concentration of salts. Viability of the seeds can be maintained for up to two years by storing them at 10 °C, even though it is gradually reduced to 86 % after that time. Organogenesis was observed in MS medium added with 10 µM of BAP and 1 µM of NAA, inducing 6.8 shoots per explant after 12 weeks. Shoots multiplication was obtained at the same concentrations of growth regulators as used in the induction stage. Plant elongation and rooting were achieved in MS medium at half salt concentration supplemented with 1 µM of gibberellic acid. Acclimatization of the plants was efficient in coconut fiber and bark with survival rates of 95 and 93 %, respectively.

**Index words:** *Vriesea heliconioides*, bromeliad, tissue culture, micropropagation, organogenesis.

#### INTRODUCCIÓN

Las bromeliáceas son plantas monocotiledóneas originarias del continente americano, con excepción de *Pitcairnia feliciana*, que se confina a África (Benzing *et al.*, 2000; Porembski y Barthlott, 1999). Estas plantas se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales y muestran gran capacidad de adaptación y resistencia a condiciones climáticas extremas, características que les permiten crecer principalmente como plantas epífitas, aunque también como terrestres o litófitas (Miranda *et al.*, 2007). El listado más actualizado de bromelias en el mundo incluye 3172 especies, organizadas en 58 géneros y dos notogéneros (Luther, 2008). En México se han reportado 383 especies agrupadas en 18 géneros; de ellas, cerca de 70 % presentan endemismo (Espejo-Serna *et al.*, 2004; Mondragón *et al.*, 2011). Estas 383 especies representan 12 % del total de especies de la familia y se incrementará gradualmente

a medida que se descubran nuevas especies (Espejo *et al.*, 2008; Espejo-Serna *et al.*, 2007; Flores-Cruz y Diego-Escobar, 2008).

Las bromelias se pueden usar como forraje, alimento, medicina, cercos vivos y textiles; sin embargo, el principal uso es como planta ornamental (Miranda *et al.*, 2007). La morfología típica de la planta (tanque), las formas y colores de sus brácteas, así como los llamativos colores de sus flores les otorgan una belleza única. Estas características, además de los periodos de floración prolongados y la resistencia a plagas y enfermedades de este grupo de plantas, las convierte en un recurso fitogenético y florícola valioso para las comunidades donde habitan (Benzing, 2000). La importancia que las bromelias han cobrado como plantas ornamentales hace necesaria la implementación de diversos estudios que permitan conocer su fisiología, ecología, nutrición, floración y, en especial, su propagación. Catálogos internacionales exhiben numerosas variedades comerciales de bromelias obtenidas por mejoramiento genético; sin embargo, existen especies nativas que se aprovechan como tales en regiones específicas. En estos casos las especies normalmente no cuentan con un proceso de cultivo, sino que son recolectadas de su hábitat natural, práctica que constituye una seria amenaza para las poblaciones silvestres (Mondragón y Villa-Guzmán, 2008).

*Vriesea* Lindl. es uno de los géneros con mayor número de especies dentro de la familia Bromeliaceae (Luther, 2008). *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. es una de las especies del género *Vriesea* Lindl.; es una hierba arrosada de 25 a 35 cm de alto, con hojas de color verde, ligeramente más oscuras en el haz; su inflorescencia es terminal, erecta y simple, brácteas florales color verde o rojo, flores dísticas erectas, con pétalos libres de color blanco; sus semillas son de color pardo claro, fusiformes y aplanadas; crece como epífita sobre árboles y roca caliza y es propia de la selva alta perennifolia. Esta bromelia se distribuye desde México (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz) hasta Colombia, Surinam, Venezuela y Brasil (Espejo-Serna *et al.*, 2005).

A la fecha no se dispone de información sobre propagación y cultivo de *V. heliconioides*, ya sea de forma convencional o *in vitro*, que permita aprovechar de forma sustentable su potencial ornamental como planta en maceta; por esta razón, el cultivo de tejidos vegetales es una herramienta importante para la propagación y conservación de la especie. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivos determinar las condiciones óptimas para la germinación *in vitro* de semillas de *V. heliconioides*, evaluar su viabilidad y desarrollar un sistema de regeneración vía organogénesis a partir de plántulas obtenidas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Fuente de semillas y desinfección

Las semillas se extrajeron de cápsulas maduras colectadas de poblaciones silvestres ubicadas en el parque estatal de la Sierra del estado de Tabasco, México; éstas se lavaron con detergente comercial por 5 min y se enjuagaron con agua de la llave y agua destilada estéril. Después, se sumergieron en hipoclorito de sodio comercial Cloralex® (NaOCl 30 % v/v) y Tween 20® (Sigma-Aldrich, 0.05 % v/v) durante 15 min y enseguida se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada. Posteriormente, las semillas se sumergieron en Captan (N-triclorometilto-4-ciclohexeno-1,2 dicarboximida, 1 g L<sup>-1</sup>) durante 10 min y nuevamente se enjuagaron cinco veces con agua destilada esterilizada.

### Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo empleado en la germinación, inducción, alargamiento y enraizamiento de los brotes fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962) con las sales inorgánicas completas, suplementado con sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), glicina (2 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0.5 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (0.5 mg L<sup>-1</sup>), tiamina (0.1 mg L<sup>-1</sup>) y agar-agar (Merck®, 7 g L<sup>-1</sup>). El pH del medio se ajustó a 5.7 con NaOH o HCl 1N y se esterilizó en una autoclave vertical (FELISA®, Modelo FE-405, México) a 121 °C y 1.5 kg cm<sup>-2</sup> de presión por 20 min. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C, 16 h de luz e intensidad luminosa de 45 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### Germinación *in vitro* y crecimiento de plántulas

Las semillas se sembraron en frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio de cultivo MS completo o a la mitad de su concentración de sales minerales, sin y con carbón activado (0.5 g L<sup>-1</sup>); cuatro semanas después de la siembra se contabilizó el porcentaje de semillas germinadas. Para promover el crecimiento de las plántulas se hicieron subcultivos a los mismos medios de cultivo cada cuatro semanas, y a las 12 semanas se midió la altura de las plántulas y el número de raíces. El experimento se condujo en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y la unidad experimental consistió en un frasco con 20 semillas.

### Viabilidad de semillas

Las semillas se colocaron en sobres de papel manila y se conservaron a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) o en refrigeración (10 °C) durante dos años; después de 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses, lotes de 200 semillas se sembraron en el mejor medio de cultivo obtenido en la etapa de

germinación; 20 semillas se colocaron en cada frasco y su germinación (porcentaje) se evaluó después de 30 d.

### Regeneración vía organogénesis

#### Inducción de brotes

Plántulas de 12 semanas germinadas *in vitro* con longitud de 1 a 1.5 cm se colocaron en frascos de vidrio de 90 mL de capacidad que contenían 30 mL de medio MS completo adicionado con 6-bencilaminopurina (BAP; 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) y ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA; 1 y 2  $\mu\text{M}$ ); subcultivos a medio fresco se hicieron cada seis semanas. A las 12 semanas se cuantificó el número de explantes que generaron brotes, el número de brotes por explante y la longitud de brote (cm). Se usó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones y la unidad experimental consistió en un frasco con tres plántulas.

#### Multiplicación de brotes

Para promover la multiplicación se seleccionaron 60 brotes de 1.5 a 2 cm de longitud y se establecieron en la mejor combinación de BAP y ANA resultante de la fase de inducción. En cada frasco con medio de cultivo se establecieron tres brotes y durante dos ciclos de cultivo de ocho semanas se cuantificó el número de brotes por explante al final de cada ciclo.

#### Alargamiento y enraizamiento de plantas

Brotes de 3.0 cm de longitud se transfirieron a medio MS completo o a la mitad de su concentración de sales minerales, sin y con 1  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico ( $\text{AG}_3$ ). Después de 12 semanas se cuantificó el enraizamiento (%), número de raíces y altura de las plantas (cm). El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones; la unidad experimental fue una planta por frasco.

#### Aclimatación de plantas

Plantas de 6.0 cm de altura se colocaron en macetas

de 0.5 L con fibra de coco (*Cocos nucifera*), corteza y una mezcla de turba (peat moss) y perlita (1:1). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero por ocho semanas a 26 °C y se regaron cada tercer día con las sales MS a la mitad de su concentración, para posteriormente evaluar su supervivencia (%). Se usó un diseño experimental completamente al azar con 30 repeticiones y la unidad experimental fue una planta.

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos en cada experimento se sometieron a análisis de varianza con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 2003) y la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) se usó para la comparación de medias. Los valores de porcentaje se transformaron mediante la raíz cuadrada.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Germinación *in vitro*

La composición del medio de cultivo afectó significativamente la altura de las plántulas, número de raíces y longitud de las mismas. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para la germinación, mientras que el crecimiento de las plántulas fue mayor en el medio MS con las sales completas. En cuanto al número de raíces, éste fue favorecido por el medio MS a la mitad de la concentración de sales con o sin carbón activado, y su longitud por el medio MS a la mitad de su concentración con carbón activado (Cuadro 1).

La germinación, considerada como la emergencia de la radícula, se presentó después de 7 d de cultivo en todos los tratamientos (Figura 1a) y a las ocho semanas se observaron las primeras hojas (Figura 1b). La propagación por semillas es el método más viable de reproducción de bromelias en condiciones naturales; sin embargo, aunque se ha reportado que las semillas no enfrentan mayores problemas para la germinación (Benzing, 2000), la proporción de plántulas que alcanza el estado adulto regularmente es limitada.

**Cuadro 1. Germinación *in vitro* de semillas, altura de plántula, número y longitud de raíces de *V. heliconioides*.**

MS (%) + CA (g L <sup>-1</sup> )	Germinación (%) <sup>†</sup>	Altura de plántula (cm) <sup>††</sup>	Número de raíces <sup>††</sup>	Longitud de raíces (cm) <sup>††</sup>
100 + 0	96.5 a	2.1 a	2.7 b	0.5 c
100 + 0.5	97.0 a	2.0 a	2.8 b	0.6 c
50 + 0	99.0 a	1.6 b	3.5 a	0.9 b
50 + 0.5	100.0 a	1.5 b	4.1 a	1.1 a
DMSH	3.0	0.2	0.6	0.15

MS: murashige y skoog; CA: carbón activado; <sup>†</sup>Datos tomados a las cuatro semanas; <sup>††</sup>Datos tomados a las 12 semanas. Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05); DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

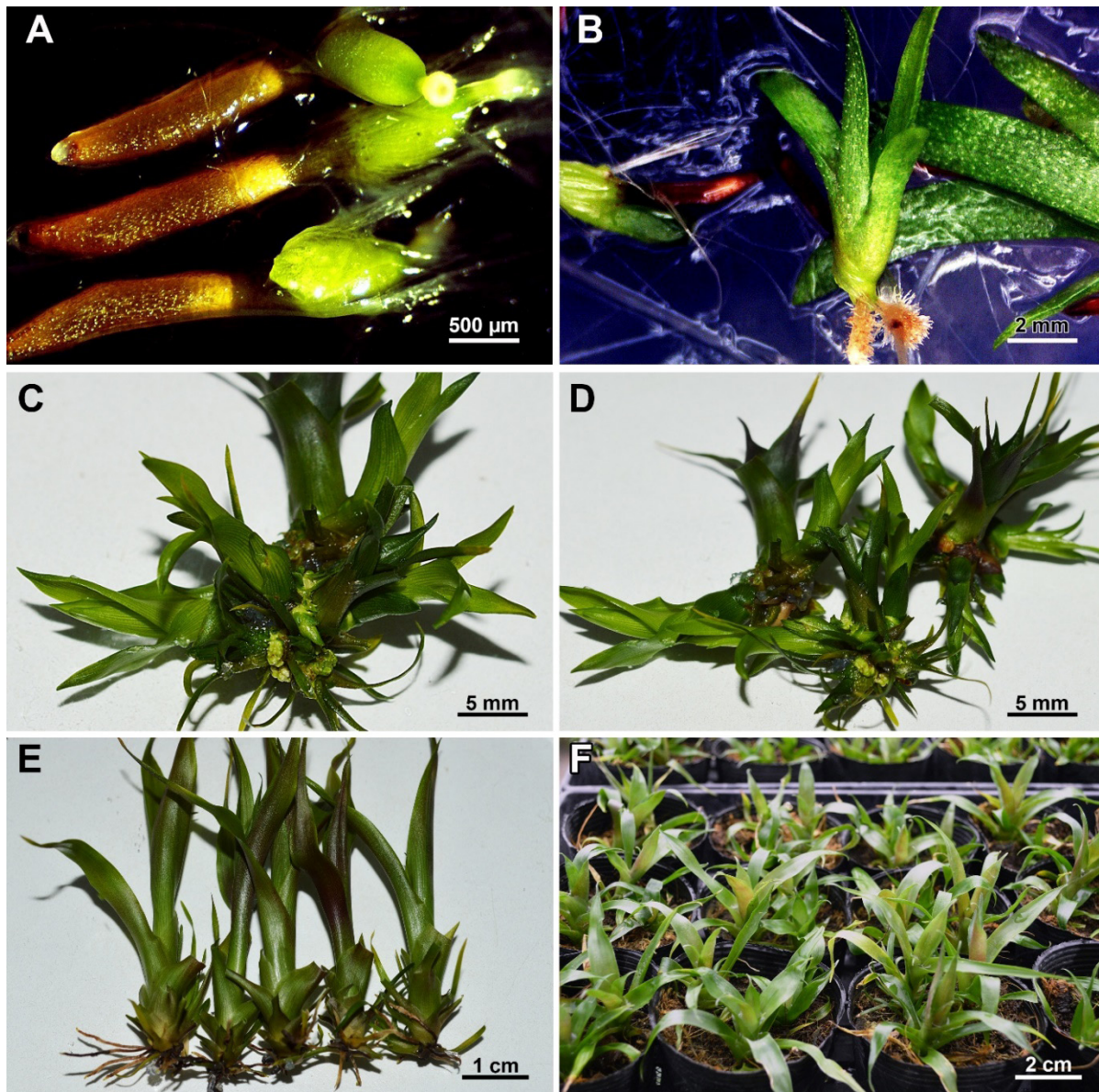


Figura 1. Germinación *in vitro* de *V. heliconioides* y regeneración vía organogénesis. A) Inicio de germinación en medio MS a la mitad de concentración de sales después de una semana de cultivo; B) Plántula con hojas después de ocho semanas de cultivo; C) Inducción de brotes; D) Multiplicación de brotes en medio MS adicionado con 10  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de ANA después de 12 semanas de cultivo; E) Alargamiento y enraizamiento de plantas en medio MS a la mitad de sales adicionado con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  a las 12 semanas de cultivo; F) Aclimatación de plantas en fibra de coco después de 10 semanas.

Para la germinación *in vitro* de bromelias se ha probado con éxito el medio de cultivo C de Knudson (Knudson, 1946) y sus modificaciones (Mercier y Kerbauy, 1992; Pickens *et al.*, 2003); sin embargo, los mejores resultados se han alcanzado con el medio MS, ya sea con las sales completas o a la mitad de su concentración (Guerra y Dal Vesco, 2010). El porcentaje de germinación de las semillas de *V. heliconioides* en el medio MS fue alto, tanto con la concentración completa del medio MS como al 50 % de sales. En contraste, las semillas de *V. gigantea* y *V. philippocoburgii*

germinaron en el medio MS con las sales completas, pero después de algunas semanas las plántulas no prosperaron (Droste *et al.*, 2005). En *V. scalaris* la baja tasa de germinación obtenida (60 %) también se atribuyó a las sales completas del medio MS (Da Silva *et al.*, 2009).

La germinación de semillas de *V. heliconioides* en condiciones naturales no está documentada, pero por tratarse de una especie epífita está condicionada a que las semillas se depositen sobre la corteza de árboles, lianas, troncos o

grietas de rocas; en el suelo las semillas germinan pero no prosperan. Si bien una inflorescencia puede producir de 5 a 12 cápsulas con 375 a 420 semillas por cápsula, se desconoce el porcentaje de germinación en su hábitat natural, aunque probablemente es reducido. Por estas razones, la germinación *in vitro* de semillas de *V. heliconioides* podría incrementar sustancialmente la cantidad de plantas que alcancen el estado adulto para la recuperación de poblaciones silvestres y su eventual aprovechamiento sustentable.

### Viabilidad de las semillas

Las semillas almacenadas por 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses mostraron diferente capacidad para germinar cuando se sembraron en medio MS a la mitad de concentración de sales adicionado con 0.5 g L<sup>-1</sup> de carbón activado. Las semillas almacenadas a 10 °C mostraron porcentajes de germinación más altos que aquellas conservadas a temperatura ambiente. En las semillas almacenadas a 10 °C durante un año el porcentaje de germinación se mantuvo entre 98 y 100 %, mientras que en las almacenadas durante 18 y 24 meses, la germinación se redujo a 95 y 86 %, respectivamente (Cuadro 2).

Las semillas almacenadas a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) mostraron 100 % de germinación sólo durante el primer año y después de 24 meses ésta se redujo hasta 72 % (Cuadro 2).

Conocer el comportamiento de la germinación de las semillas de *V. heliconioides* es esencial para diseñar estrategias de conservación y aprovechamiento de esta especie. En bromelias se ha reportado que las semillas pueden mantenerse viables de forma natural por seis meses (Miranda *et al.*, 2007); sin embargo, este periodo es variable entre especies. Los resultados observados en la presente investigación son similares a los obtenidos en *Guzmania lingulata*, *Tillandsia fasciculata* y *V. sanguinolenta*, donde el almacenamiento en frío (-20 °C) permitió que 93 % de las semillas germinaran después de dos años (Zotz, 2013). Si bien no hay estudios de viabilidad de semillas de bromelias *in vitro*,

**Cuadro 2. Germinación *in vitro* de semillas de *V. heliconioides* almacenadas en dos condiciones de temperatura durante dos años.**

Temperatura (°C)	Germinación (%)					
	3 m	6 m	9 m	12 m	18 m	24 m
10	100	98	99	98	95	86
26 ± 1	100	100	100	100	90	72
Desviación estándar	0	1.0	0.5	1.0	2.5	7.0

m: meses.

la observada en *V. heliconioides* supera a la reportada en otras especies en condiciones *ex vitro*. En *Aechmea bracteata* las semillas recién cosechadas no tienen problemas para su germinación; sin embargo, sólo 75 % de las que son almacenadas durante un año germinan, mientras que después de dos años pierden su capacidad para germinar (Goode y Allen, 2009). En especies del género *Tillandsia* se puede conservar la germinación 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 % de éstas germinó (Flores-Palacios *et al.*, 2015). Por otra parte, las semillas de *Guzmania lingulata*, *Tillandsia fasciculata* y *V. sanguinolenta* almacenadas durante un año a 22 °C mantuvieron porcentajes de germinación cercanos a 100 %; sin embargo, después de dos años la germinación fue menor a 25 % (Zotz, 2013).

La temperatura es un factor importante para la conservación de semillas, y para varias especies de bromelias la temperatura baja tiene un efecto positivo. En el presente estudio el almacenamiento de semillas de *V. heliconioides* a 10 °C fue suficiente para mantener su viabilidad hasta por dos años. Es probable que la rápida pérdida de viabilidad en *V. heliconioides* y otras bromelias se relacione con su origen tropical, ya que las semillas de muchas especies que crecen en estos climas pueden ser recalcitrantes, aspecto que dificulta el almacenamiento y la preservación de su diversidad en bancos de semillas (Bewley *et al.*, 2013). No obstante, el hecho de que las semillas de *V. heliconioides* permanezcan viables durante un año podría ayudar a preservar sus poblaciones en condiciones naturales, al coincidir con los periodos de lluvia propios de la selva alta perennifolia.

### Regeneración vía organogénesis

#### Inducción de brotes

Todas las combinaciones de BAP y ANA indujeron la formación de brotes en los explantes; sin embargo, sólo los explantes cultivados en 5 y 15 µM de BAP y 1 y 2 de ANA µM mostraron un número de brotes significativamente menor (3.3 a 5.3) que aquellos cultivados en 10 µM de BAP y 1 µM de ANA (6.8) (Cuadro 3) (Figura 1c). En contraste, sólo los brotes obtenidos en una combinación de 10 µM de BAP y 1 µM de ANA tuvieron una longitud significativamente menor (0.63) que la de los obtenidos con 5 µM de BAP y 1 µM de ANA (0.83) (Cuadro 3). El crecimiento lento es un aspecto que caracteriza a las bromelias; este comportamiento también se observó en la propagación *in vitro*, aunque se aceleró por los nutrientes del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento. Se desconoce el tiempo preciso que transcurre para que una planta alcance su

estado adulto e inicie la floración, pero se sabe que puede tardar desde meses hasta años.

**Cuadro 3. Inducción de brotes a partir de plántulas de *V. heliconioides* obtenidas *in vitro* en presencia de bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) después de 12 semanas de cultivo.**

BAP ( $\mu\text{M}$ ) + ANA ( $\mu\text{M}$ )	Explantos que generaron brotes (%)	Número de brotes por explante	Longitud de brote (cm)
5 + 1	100 a	3.3 c	0.83 a
5 + 2	100 a	3.8 c	0.71 ab
10 + 1	100 a	6.8 a	0.63 b
10 + 2	100 a	6.2 ab	0.69 ab
15 + 1	100 a	5.6 ab	0.81 ab
15 + 2	100 a	5.3 b	0.80 ab
DMSH	0	1.2	0.18

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05); DMSH: diferencia mínima significativa honesta.

La eficiencia del BAP y ANA observada en *V. heliconioides* también ha sido reportada en la propagación *in vitro* de otras especies de *Vriesea* utilizando plántulas como explante. En la organogénesis de *V. fosteriana* se obtuvieron en promedio 22.5 brotes por plántula después de tres meses de cultivo en el medio Knudson adicionado con 8.9  $\mu\text{M}$  de BAP y 2.7  $\mu\text{M}$  de ANA (Mercier y Kerbauy, 1992); en contraste, para *V. hieroglyphica* la máxima cantidad de brotes (7) se produjo con el mismo medio de cultivo y las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento pero después de seis meses (Mercier y Kerbauy, 1994). En *V. gigantea* el medio MS adicionado con 8.9  $\mu\text{M}$  de BAP y 2.7  $\mu\text{M}$  de ANA indujo la mayor cantidad de brotes (3.1) después de cuatro meses de cultivo, mientras que en *V. philippocoburgii* la mejor respuesta (5.0 brotes por explante) se alcanzó con estas mismas concentraciones de BAP y ANA pero en el medio Knudson (Droste *et al.*, 2005).

El número de brotes generados en *V. heliconioides* en comparación con otras especies de bromelias refleja las diferencias en la capacidad morfogénica de acuerdo con el genotipo y el estado fisiológico del explante. Aunque la combinación de BAP y ANA ha logrado inducir la organogénesis en diversas especies de bromelias, es necesario optimizar las condiciones de cultivo para la propagación *in vitro* de cada especie.

### Multiplicación de brotes

En el primer ciclo de multiplicación de ocho semanas, el número promedio de brotes por explante fue de 7.4, con una longitud media de 0.62 cm cuando se cultivaron en el medio MS adicionado con 10  $\mu\text{M}$  de BAP y 1  $\mu\text{M}$  de ANA, que fue una de las combinaciones de reguladores de crecimiento que más favoreció la organogénesis, en tanto que en el segundo ciclo los explantes mostraron un ligero incremento en su capacidad organogénica al formar en promedio 7.8 brotes de 0.57 cm de longitud (Figura 1d).

Durante la etapa de multiplicación en la propagación *in vitro* de algunas bromelias se han empleado los mismos reguladores de crecimiento que han favorecido la inducción (Guerra y Dal Vesco, 2010). En *V. heliconioides* y *V. caccuminis* el BAP y ANA utilizados en la etapa de inducción también promovieron la multiplicación de los brotes (9.3 brotes por explante) (De Resende *et al.*, 2016); en tanto que en *Nidularium fulgens*, la combinación de thidiazuron (0.1  $\mu\text{M}$ ) y ANA (2.7  $\mu\text{M}$ ) indujo la mejor respuesta en la etapa de multiplicación (12.1 brotes por explante) (Paiva *et al.*, 2009).

### Alargamiento y enraizamiento de plantas

El enraizamiento se obtuvo tanto con el medio MS completo o a la mitad de su concentración, con o sin  $\text{AG}_3$ ; sin embargo, el número de raíces fue mayor al emplear la mitad de la concentración de sales, con o sin  $\text{AG}_3$  (3.9 a 4.6) (Cuadro 4). Por otro lado, las plantas duplicaron su tamaño en la mayoría de los tratamientos después de 12 semanas de cultivo; los brotes que crecieron en el medio MS completo adicionado con 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  mostraron un tamaño significativamente mayor (7.6 cm) que el de aquellos que se cultivaron en el medio MS completo o a la mitad de la concentración sin  $\text{AG}_3$  (Cuadro 4; Figura 1e). El enraizamiento inició a partir de la cuarta semana de cultivo y al mismo tiempo el envés de las hojas comenzó a tornarse de color morado claro, típico de las plantas juveniles de *V. heliconioides*.

En *V. heliconioides* la formación de raíces resultó eficiente con el medio de cultivo MS completo o a la mitad de concentración de sales, y no requirió la adición de auxinas, como se ha reportado en otras especies de bromelias. Al respecto, la inducción de raíces en brotes de *V. scalaris* fue mejor en el medio MS sin reguladores que con ácido indolbutírico (Da Silva *et al.*, 2009).

En *V. fosteriana*, *V. gigantea* y *V. philippocoburgii* el enraizamiento fue promovido con 1.1  $\mu\text{M}$  de ANA (Droste *et al.*, 2005; Mercier y Kerbauy, 1992), mientras que en *V. caccuminis* la combinación de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{AG}_3$  y 1.5  $\mu\text{M}$  de ANA

**Cuadro 4. Alargamiento y enraizamiento de brotes de *V. heliconioides* después de 12 semanas de cultivo.**

MS (%) + AG <sub>3</sub> (μM)	Altura de planta (cm)	Enraizamiento (%)	Número de raíces
100 + 0	6.5 b	100 a	2.9 b
100 + 1	7.6 a	100 a	3.0 b
50 + 0	5.4 c	100 a	4.6 a
50 + 1	6.9 ab	100 a	3.9 a
DMSH	0.8	0	0.9

Medias con letras iguales dentro de cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05); DMSH: diferencia mínima significativa honesta; MS: Murashige y Skoog; AG<sub>3</sub>: ácido giberélico.

estimuló la formación de 2.3 raíces por planta (De Resende *et al.*, 2016). En esta última especie se atribuyó un efecto positivo del AG<sub>3</sub> en combinación con ANA sobre el enraizamiento; sin embargo, en *V. heliconioides* el número de raíces fue mayor en ausencia de la giberelina. Si bien en los sistemas de propagación *in vitro* el enraizamiento es una fase crítica previa a la aclimatación (George *et al.*, 2008), en bromelias la presencia de raíces adventicias se considera innecesaria y ésta se puede inducir *ex vitro* (Guerra y Dal Vesco, 2010). Las raíces de bromelias epífitas tienen como función principal el soporte de la planta en estado adulto; específicamente en los géneros *Tillandsia* y *Vriesea*, la absorción de humedad y nutrientes es llevada a cabo por las hojas, donde la presencia de tricomas peltados es más abundante (Mondragón *et al.*, 2011).

En el presente estudio, 1 μM de AG<sub>3</sub> promovió el alargamiento de los brotes, aunque redujo ligeramente el número de raíces; las plantas aumentaron de 2.3 a 2.5 veces su tamaño original lo que superó la respuesta de los tratamientos donde este regulador se omitió. En *V. friburgensis* var. *paludosa* y *Dyckia distachya* el alargamiento fue promovido con 5 μM de AG<sub>3</sub> (Alves y Guerra, 2001; Pompelli y Guerra, 2005), mientras que en *V. reitzii* los mejores resultados se obtuvieron con 10 μM de AG<sub>3</sub> (Dal Vesco y Guerra, 2010; Rech Filho *et al.*, 2005). Se ha sugerido que en las bromelias la adición de 5 a 10 μM de AG<sub>3</sub> al medio de cultivo promueve el alargamiento; sin embargo, la efectividad de este regulador de crecimiento dependerá de la especie.

En la propagación *in vitro* de bromelias se ha reportado que la altura de la planta, más que su capacidad para formar raíces, es el factor limitante en la aclimatación, ya que 3 cm es el tamaño mínimo para que ésta sea exitosa (Guerra y Dal Vesco, 2010).

## Aclimatación de plantas

La supervivencia de las plantas de *V. heliconioides* 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 %. Las hojas más externas se tornaron de color amarillento y necróticas después de cuatro semanas; sin embargo, las plantas continuaron su crecimiento normal formando nuevas hojas y un sistema radical más completo (Figura 1F). En la aclimatación de bromelias no se ha definido un sustrato ideal, pero se han empleado mezclas de corteza de pino (*Pinus* L.), cáscara de arroz (*Oryza sativa* L.) carbonizada, vermiculita, turba, arena y fibra de coco con resultados favorables (Dal Vesco y Guerra, 2010; De Resende *et al.*, 2016; Rech Filho *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo *in vitro* establecidas en la presente investigación permitieron que un alto porcentaje de las semillas de *V. heliconioides* germinara. La viabilidad de las semillas de esta especie puede mantenerse hasta por dos años si se almacenan a 10 °C. Se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de *V. heliconioides* a partir de plántulas obtenidas *in vitro*, en el que el número más alto de brotes por explante se obtuvo al adicionar 10 μM de BAP y 1 μM de ANA al medio MS, el alargamiento y enraizamiento de las plantas se logró con la mitad de la concentración de sales MS más 1 μM de AG<sub>3</sub>, y cultivar las plantas en fibra de coco y corteza permitió la máxima supervivencia en la fase de aclimatación.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del Jardín Agrícola Tropical de la Unidad Regional Universitaria Sur Sureste de la Universidad Autónoma Chapingo por su colaboración en la identificación taxonómica de la especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alves G. M. and M. P. Guerra (2001) Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of Bromeliad Society* 51:202-212.
- Benzing D. H., B. Bennett, G. Brown, M. Dimmitt, H. Lutter, I. Ramírez, R. Terry and W. Till (2000) Bromeliaceae: Profile of an Adaptive Radiation. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 690 p.
- Bewley J. D., K. J. Bradford, H. W. M. Hiltner and H. Nonogaki (2013) Seeds. Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3rd ed. Springer. New York, USA. 392 p.
- Da Silva A. L. L., E. T. H. Franco, E. B. Dornelles, C. L. R. Bortoli and M. Quoirin (2009) *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). *Iheringia Série Botânica* 64:151-156.
- 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.030>
- De Resende C. F., C. Ribeiro, G. C. Mendes, C. Q. G. Soares, V. F. Braga, B. P. da Cruz, R. C. Forzza and P. H. P. Peixoto (2016) *In vitro* culture of

- Vriesea cacuminis* L. B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia, Série Botânica* 71:55-61.
- Droste A., A. M. Da Silva, A. V. Matos and J. W. de Almeida (2005) *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48:717-722, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132005000600006>.
- Espejo A., A. R. López-Ferrari y W. Till (2008) Dos nuevas especies de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana* 85:45-62.
- Espejo-Serna A., A. R. López-Ferrari e I. Ramírez-Morillo (2005) Flora de Veracruz. Bromeliaceae. Fascículo 136. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz, México. 312 p.
- Espejo-Serna A., A. R. López-Ferrari, I. Ramírez-Morillo, B. K. Holst, H. E. Luther and W. Till (2004) Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism. *Selbyana* 25:33-86.
- Espejo-Serna A., A. R. López-Ferrari, I. Ramírez-Morillo y N. Martínez-Correa (2007) Dos nuevas especies de *Hechtia* (Bromeliaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana* 78:97-109.
- Flores-Cruz M. y M. V. Diego-Escobar (2008) Una especie nueva de *Tillandsia* (Bromeliaceae) de Guerrero, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 82:15-20.
- 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, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.003>.
- George E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk (2008) Micropropagation: uses and methods. In: Plant Propagation by Tissue Culture. 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 1. The Background. E. F. George, M. A. Hall and G. J. De Klerk (eds.). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:29-64.
- Goode L. K. and M. F. Allen (2009) Seed germination conditions and implications for establishment of an epiphyte, *Aechmea bracteata* (Bromeliaceae). *Plant Ecology* 204:179-188, <http://dx.doi.org/10.1007/s11258-009-9582-7>.
- 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, [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1\\_6](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_6).
- Knudson L. (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 14:214-217.
- Luther H. E. (2008) An Alphabetical List of Bromeliad Binomials. 11th edition. The Bromeliad Society International. Sarasota, Florida, USA. 110 p.
- Mercier H. and G. B. Kerbauy (1992) *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30:247-249.
- Mercier H. and G. B. Kerbauy (1994) *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. *Journal of the Bromeliad Society* 44:120-124.
- Miranda J. M. E., 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, Grupo Autónomo para la Investigación Ambiental A.C. Oaxaca, Oaxaca, México. 98 p.
- Mondragón C. D. M., I. M. Ramírez M., M. Flores C. y J. G. García F. (2011) La Familia Bromeliaceae en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 100 p.
- Mondragón D. y D. M. Villa-Guzmán (2008) Estudio etnobotánico de las bromelias epífitas en la comunidad de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México. *Polibotánica* 26:175-191.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Paiva O. P. D., V. C. Naves, L. F. Dutra, R. Paiva and M. Pasqual (2009) *In vitro* propagation of *Nidularium fulgens* Lem. *Interciencia* 34:593-596, <http://dx.doi.org/0378-1844/09/08/593-04>.
- Pickens K. A., J. M. Affolter, H. Y. Wetzstein and J. H. D. Wolf (2003) Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience* 38:101-104.
- Pompelli M. F. and M. P. Guerra (2005) Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5:117-126.
- Porembski S. and W. Barthlott (1999) *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers in Botany* 4:175-184.
- Rech Filho A., L. L. Dal Vesco, R. O. Nodari, R. W. Lischka, C. V. Müller and M. P. Guerra (2005) Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation* 14:1799-1808, <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-004-0700-5>.
- SAS Institute (2003) The SAS System for Windows. Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA.
- Zotz G. (2013) A longer story than expected: seeds of several species (Tillandsioideae) remain viable for up to two years. *Journal of the Bromeliad Society* 63:83-86.