

## MORFOGÉNESIS IN VITRO A PARTIR DE YEMAS APICALES Y BASES DE HOJAS DE LAS ESPECIES DE BROMELIAS *AECHMEA VEITCHII* Y *RACINAEA CRISPA*

IN VITRO MORPHOGENESIS FROM APICAL BUDS AND LEAF BASES  
OF THE BROMELIA SPECIES *AECHMEA VEITCHII* AND *RACINAEA CRISPA*

Ana M. Calderón-Arias<sup>1,3</sup>, Andrea Restrepo-Gómez<sup>1,4</sup>, Aura I. Urrea-Trujillo<sup>2,5</sup>

### Resumen

Las bromelias son un recurso promisorio presente en nuestros bosques neotropicales. Sin embargo, debido a su extracción no controlada y a la intervención de sus hábitats, algunas poblaciones de estas plantas han disminuido drásticamente, al punto que muchas de ellas se encuentran en grado de amenaza de extinción. Por lo que técnicas de propagación eficientes como el cultivo de tejidos, constituyen un aporte a las estrategias de conservación y manejo sostenible de este recurso, como en el caso de las especies *Aechmea veitchii* (Baker) y *Racinaea crispa* (Baker). Con este propósito se utilizaron como explantes porciones de hojas de plantas de campo, y yemas apicales y porciones de hojas de plántulas obtenidas in vitro, a partir de semillas. Se evaluó el efecto de diferentes combinaciones y concentraciones de auxinas y citoquininas sobre la formación de callo embriogénico o no embriogénico y la regeneración de brotes, utilizando como medio basal las sales MS con los macronutrientes a media y completa concentración. Los explantes provenientes de plantas de campo no presentaron respuesta; por el contrario las yemas apicales de plántulas germinadas in vitro de *A. veitchii*, con **IBA** (1,0 mg/l), formaron brotes adventicios, las combinaciones **TDZ** (0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 mg/l) con **IBA** (0,1 mg/l) y **BAP** (5 mg/l) con **ANA** (0,2 mg/l) indujeron malformaciones en los brotes desarrollados y multiyemas. Las bases de hojas de *A. veitchii* presentaron menor respuesta a la formación de brotes adventicios y multiyemas; sin embargo, en el medio suplementado con KIN más 2,4-D se presentó formación de callo. Fue posible el establecimiento in vitro de *R. crispa* a partir de semillas, sin embargo la respuesta a las combinaciones hormonales fue incipiente.

*Palabras clave:* bromelias, brotes adventicios, organogénesis, propagación in vitro

### Abstract

The bromeliads are a promissory resource in our Neotropical forests. However, due to their uncontrolled harvest and the devastation of their habitats, some populations of these plants have declined drastically to the point that many are threatened with extinction. Thus, efficient propagation techniques such as tissue culture constitute an aid to conservation and sustainable management strategies for these resources, as in the case of *Aechmea veitchii* Baker and *Racinaea crispa* Baker. To this end, leaf segments of field plants, and apical buds and leaf segments of plantlets cultured in vitro, were used as explants. The effect of different combinations and concentrations of auxin and cytokines on callus formation, type of callus and shoot regeneration were evaluated, using MS medium with half and complete salt concentrations as basal medium. Results showed that there was no response when using explants from field plants; however, in vitro seedlings, adventitious buds were developed on the apical buds of *A. veitchii*, in MS medium with **IBA** (1.0 mg/l), **TDZ** (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/l) with **IBA** (0.1 mg/l) and **BAP** (5.0 mg/l) with **ANA** (0.2 mg/l) induced malformed buds and shoot clusters. A low percentage of adventitious shoots and bud clusters were obtained from the basal region of the young leaves of *A. veitchii*; however, in MS medium

Recibido: noviembre 2010; aceptado: mayo 2011.

<sup>1</sup> Bióloga. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

<sup>2</sup> Docente. Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: <sup>3</sup> <amacar5@gmail.com>; <sup>4</sup> <orfeo135@hotmail.com>; <sup>5</sup> <aurrea@matematicas.udea.edu.co>.

supplemented with kinetin and 2,4D nodular, callus formation was obtained. In vitro propagation of *R. crisper* from seeds was possible, but its response to the growth regulators evaluated was poor and no plants were regenerated.

*Key words:* adventitious shoots, bromeliad, in vitro propagation, organogenesis

## INTRODUCCIÓN

La familia Bromeliaceae es esencialmente neotropical con excepción de la especie, *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms y Midbr., localizada al oeste del continente africano (Smith y Downs 1974). La familia se divide en tres subfamilias: Pitcairnioideae; Tillandsioideae y Bromelioideae, en estas dos últimas se encuentran las especies de interés en este estudio: *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*, respectivamente (Moreira 2006).

Las bromelias son un recurso vegetal promisorio presente en los bosques del departamento de Antioquia (Colombia), pero la destrucción de su hábitat y la extracción intensiva debido a su alto valor ornamental ha ocasionado la fuerte disminución de las poblaciones en este departamento colombiano (Corantioquia 2007), y se encuentran muchas de ellas en alto grado de amenaza de extinción, como lo muestran las cifras presentadas en el libro rojo de plantas de Colombia (Betancur y García 2006), pues de las 492 especies de bromelias que crecen de manera silvestre en Colombia, 160 se encuentran bajo alguna categoría de amenaza de extinción, es decir, cerca del 33% del total de especies. De estas, 123 especies son endémicas de Colombia y 74 de ellas son conocidas en una sola localidad.

Colombia no cuenta, para esta familia, con un banco significativo de germoplasma más allá del existente en jardines botánicos o entre coleccionistas. Solo unos pocos estudios fenológicos han sido realizados, así como la evaluación de métodos de propagación eficientes, ya sea vía asexual o por semillas. Estos estudios son requisito relevante ya que el conocimiento de la biología de una especie facilita la implementación

de programas de conservación y uso sostenible, incluyendo el uso de técnicas biotecnológicas para la recuperación de las poblaciones.

Los programas de manejo y conservación de las poblaciones de esta familia se hacen cada vez más urgentes conociendo que gran número de especies requieren una cobertura boscosa para su establecimiento y desarrollo, muchas son dependientes de los hospederos y por lo tanto son muy vulnerables a cualquier cambio en las condiciones de humedad y radiación solar (Betancur y García 2006). Aunque la reproducción puede ser asexual o sexual, la propagación por semillas en algunas especies requiere condiciones especiales ya sea de humedad, temperatura o largo tiempo de germinación (Davidson 1985), como en el caso de las especies del género *Vriesea*, que producen semillas con baja capacidad de germinación (Mercier y Barbante 1995), o algunas especies del género *Puya*, en las que la germinación y la viabilidad de las semillas depende de la temperatura (Vadillo et al. 2004).

Por lo anterior, es prioritario implementar otros métodos de propagación masiva como una alternativa a las estrategias de conservación y manejo a los procesos de reintroducción en su hábitat. La propagación in vitro ofrece ventajas sobre la propagación convencional, entre ellas una rápida multiplicación de plantas libres de patógenos y almacenamiento de germoplasma en ambientes asépticos, además, facilita el intercambio internacional de germoplasma. De acuerdo con Melo (1996), la calidad de las plantas provenientes de producción comercial es superior a aquellas obtenidas de la extracción ilegal, además los costos reducidos colocan a las plantas de vivero en ventaja respecto a las

de otro tipo de mercado. La sensibilización en cuanto a la conservación y producción comercial de bromelias puede disminuir la situación de peligro en la que estas se encuentran (Andrade y Demattê 1999).

La regeneración in vitro en diferentes especies de bromelias ha sido descrita por Droste et al. (2005), Lopes et al. (2009), Mercier y Barbante (1992, 1994), Saucedo y Ramos (2008); en especies del género *Tillandsia* Roostika y Mariska (2003); vía embriogénesis y organogénesis en piña (*Ananas comosus*) Firoozabady y Moy (2004); en *Pseudoananas sagenarius* Avico et al. (2006); en *Vriesea scalaris* Pickens et al. (2006); en *Vriesea reitzii* Alves et al. (2006); en *Aechmea* "Little Harv" y *Tillandsia cyanea* Cueva et al. (2006); y en *Nidularium fulgens* Duarte et al. (2009), entre otras.

En Colombia, la propagación de especies de bromelias se ha limitado a la propagación asexual mediante técnicas convencionales, las técnicas in vitro para la regeneración y multiplicación masiva, así como para la conservación no han sido abordadas al momento, a pesar de la cantidad de especies endémicas y con algún grado de amenaza de extinción.

En este documento se describe la germinación e inducción de morfogénesis in vitro de las especies de bromelias silvestres, *A. veitchii* y *R. crispa* presentes en los bosques del departamento de Antioquia, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Plantas de las especies, *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*, fueron recolectadas en la vereda La Cejita del municipio de Santo Domingo y en la vereda el Retiro del municipio de Anorí, respectivamente. Las plantas se sembraron en macetas con una mezcla de tierra, cascarilla de pino y cáscara de

coco en una proporción de 1:1:1, y mantenidas bajo condiciones experimentales en la estación biológica de la Universidad de Antioquia para ser fuente de explantes para los experimentos in vitro (semillas y hojas). Antes de iniciar los ensayos in vitro, las plantas llevadas a vivero fueron asperjadas durante dos semanas con el biocida comercial *LonLife* (5 ml/l) con el objetivo de reducir la carga de contaminantes que es generalmente alta en plantas provenientes del bosque.

Las semillas se almacenaron en nevera a una temperatura de 10 °C durante un tiempo no superior a 3 meses.

**Establecimiento in vitro. Desinfección.** La desinfección de los explantes (hojas jóvenes de plantas de vivero y semillas) se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Para hojas jóvenes de plantas mantenidas en vivero, se realizó inicialmente un lavado superficial con jabón yodado y agua de grifo, luego fueron sumergidas en fungicida (Benlate 1 g/l) con agitación continua por 40 min. A continuación, en condiciones asépticas, se realizaron cortes (de 3 a 7 mm) a la sección de la hoja más cercana a la parte basal (Alves et al. 2006, Firoozabady y Moy 2004). Estas porciones fueron sometidas a etanol al 70% por 15 s, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio al 1% con dos gotas de *Tween* por 15 min (Alves et al. 2006, Avico et al. 2006, Droste et al. 2005). Finalmente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril antes de la siembra in vitro. Para *A. veitchii* se utilizó un tamaño de muestra de 20 explantes y el experimento se realizó por triplicado; para *R. crispa* el tamaño de muestra fue de 40 explantes y el ensayo tuvo cuatro repeticiones.

Para la desinfección de las semillas de *A. veitchii* y las cápsulas de *R. crispa* desarrolladas en las plantas mantenidas en vivero, se realizó una

inmersión inicial en Benlate (1 g/l) por 30 min; luego, en condiciones asépticas, una inmersión en alcohol al 70% por 15 s, 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 realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril antes de la siembra in vitro. Para evaluar la reproducibilidad del método se realizaron tres repeticiones para *A. veitchii* y dos repeticiones para *R. crispa*.

Las porciones de hojas fueron sembradas cada una en un tubo de ensayo que contenía el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) y mantenidos en cámara climatizada con un fotoperiodo de 16 h/luz a  $28-35 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa del 55%. A los 8 y 15 días después de la siembra se evaluó el porcentaje de contaminación y el tipo de microorganismo contaminante.

**Efecto del medio de cultivo sobre los porcentajes de germinación de las semillas; sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de plántulas de *A. veitchii* y *R. crispa*.** Con el propósito de estudiar los requerimientos de sales minerales para germinación y sobrevivencia de las plántulas de las dos especies, se evaluaron tres concentraciones de las **sales basales MS**. Dichas concentraciones fueron: **1.** Medio exento de sales, para lo cual se usó agar-agua; **2.** Sales MS completas; y **3.** Sales MS con los macronutrientes a media concentración.

Para la siembra de las semillas, se utilizaron frascos de vidrio de un litro de capacidad (7,5 cm de diámetro x 13 de altura) con 200 ml de medio de cultivo. El tamaño de muestra correspondió a tres frascos de cultivo y 30 semillas por frasco, para un total de 90 semillas. El experimento se realizó por triplicado para cada especie estudiada. Se mantuvieron las condiciones de cultivo antes descritas. Los indicadores del

efecto de la concentración de las sales MS fueron: el número de semillas germinadas 30 días después de emerger el hipocótilo en la primera semilla, número de hojas y longitud de la hoja más grande en cada una de las plantas pasados 90 días de germinada la semilla, y número de plántulas vivas transcurridos 90 días.

**Explantos, medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la respuesta organogénica o embriogénica de *A. veitchii* y *R. crispa*.** Con el propósito de estudiar el potencial de regeneración vía organogénesis y embriogénesis, se evaluó el efecto de la concentración de las sales MS y diferentes reguladores de crecimiento, solos o en combinación, sobre la regeneración y desarrollo de brotes en porciones de hojas jóvenes de plantas de vivero (5-7 mm) y de yemas apicales y porciones de hojas (3 x 3 mm en *A. veitchii* y menores de 3 x 3 mm para *R. crispa*) de las vitroplantas obtenidas de semillas.

Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y dos concentraciones de las sales MS fueron estudiadas. Para las sales MS completas se evaluaron los reguladores de crecimiento y concentraciones descritas en la tabla 1; para las sales MS con los macronutrientes a media concentración se eliminaron aquellos que incluían TDZ en su composición (tabla 2).

En todos los casos el medio fue suplementado con sacarosa 3% y agar gel (7 g/l), el pH se ajustó a 5,8 antes de esterilizar. En este ensayo el tamaño de muestra correspondió a 10 repeticiones por tratamiento, cada explante o repetición en un tubo de ensayo, para un total de 130 explantes en el caso de las sales MS completas y 80 para las sales MS con los macronutrientes a media concentración. 30 días después de la siembra, se registró el número de explantes vivos con crecimiento (formación de brotes o de callo), explantes vivos sin crecimiento y número de explantes necrosados.

**Tabla 1.** Sales MS completas y reguladores de crecimiento en la respuesta organogénica o embriogénica de *A. veitchii* y *R. crispera* (\*C = combinación)

*C	Concentración de hormonas	Referencias
1	Kin (1,0 mg/l) + 2,4-D (1,0 mg/l)	Jevremović y Radojević (2006)
2	BAP (0,22 mg/l) + ANA (5,0 mg/l)	Firoozabady y Moy (2004)
3	Kin (0,21 mg/l) + 2,4-D (4,42 mg/l)	Alves et al. (2006)
4	TDZ (1,0 mg/l) + IBA (0,1 mg/l)	Firoozabady y Moy (2004)
5	TDZ (1,5 mg/l) + IBA (0,1 mg/l)	Firoozabady y Moy (2004)
6	TDZ (2,0 mg/l) + IBA (0,1 mg/l)	Firoozabady y Moy (2004)
7	TDZ (0,5 mg/l) + IBA (0,1 mg/l)	Firoozabady y Moy (2004)
8	IBA (1,0 mg/l)	Saucedo y Ramos (2008)
9	BAP (0,5 mg/l) + AIB (2,0 mg/l) + ANA (1,0 mg/l)	Saucedo y Ramos (2008)
10	BAP (5,0 mg/l) + ANA (0,2 mg/l)	Saucedo y Ramos (2008)
<b>Control</b>	0,0 mg/l	

**Tabla 2.** Sales MS a la mitad de la concentración y reguladores de crecimiento en la respuesta organogénica o embriogénica de *A. veitchii* y *R. crispera* (\*C = combinación)

*C	Concentración de hormonas	Referencias
1	Kin (1,0 mg/l) + 2,4-D (1,0 mg/l)	Jevremović y Radojević (2006)
2	BAP (0,22 mg/l) + ANA (5,0 mg/l)	Firoozabady y Moy (2004)
3	Kin (0,21 mg/l) + 2,4-D (4,42 mg/l)	Alves et al. (2006)
4	IBA (1,0 mg/l)	Saucedo y Ramos (2008)
5	BAP (0,5 mg/l) + AIB (2,0 mg/l) + ANA (1,0 mg/l)	Saucedo y Ramos (2008)
6	BAP (5,0 mg/l) + ANA (0,2 mg/l)	Saucedo y Ramos (2008)
<b>Control</b>	0,0 mg/l	

## RESULTADOS

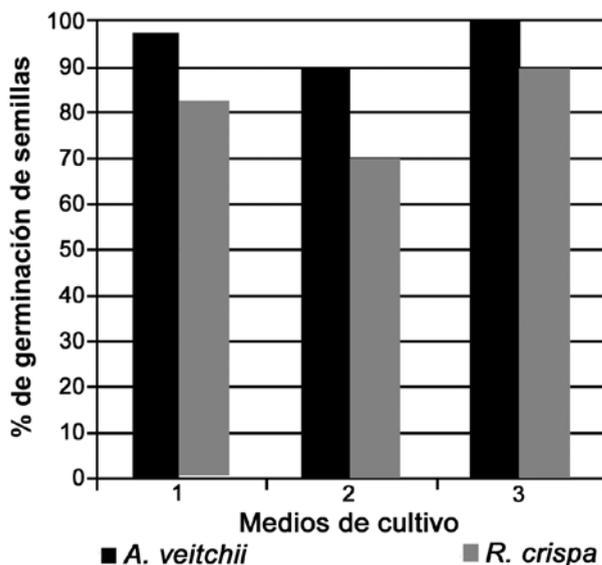
**Establecimiento in vitro.** *Desinfección.* El protocolo de desinfección aplicado a las porciones de hojas de plantas de campo permitió disminuir los porcentajes de contaminación al 12,9% para *A. veitchii* y 19,23% para *R. crispera*. El protocolo de desinfección utilizado para las semillas provenientes de plantas de campo de las dos

especies, presentó una eficiencia del 100%. Estos resultados permitieron continuar con las etapas posteriores del trabajo.

**Efecto del medio de cultivo sobre los porcentajes de germinación de semillas; sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de plántulas de *A. veitchii* y *R. crispera*.** Para lograr el crecimiento y desarrollo in vitro a partir de semillas en las

dos especies en estudio, se evaluó el efecto de la concentración de las sales MS en el medio de cultivo.

En cuanto a la germinación, cuando las semillas de *A. veitchii* fueron sembradas en el medio exento de sales (agar-agua), 30 días después de emerger el hipocótilo en la primera semilla, se obtuvo el 96,5% de germinación, en el medio con las sales MS completas fue de 88,9%, y en el medio MS con los macronutrientes a media concentración fue del 100%. Para *R. crispa* este porcentaje fue ligeramente inferior, 82,2% en agar-agua, 68,2% en MS completo, y 87% en el medio MS con los macronutrientes a media concentración (figura 1).



**Figura 1.** Porcentaje de germinación semillas para *A. veitchii* y *R. crispa* (Medios: 1 = agar-agua; 2 = MS; 3 = sales MS con los macronutrientes a media concentración)

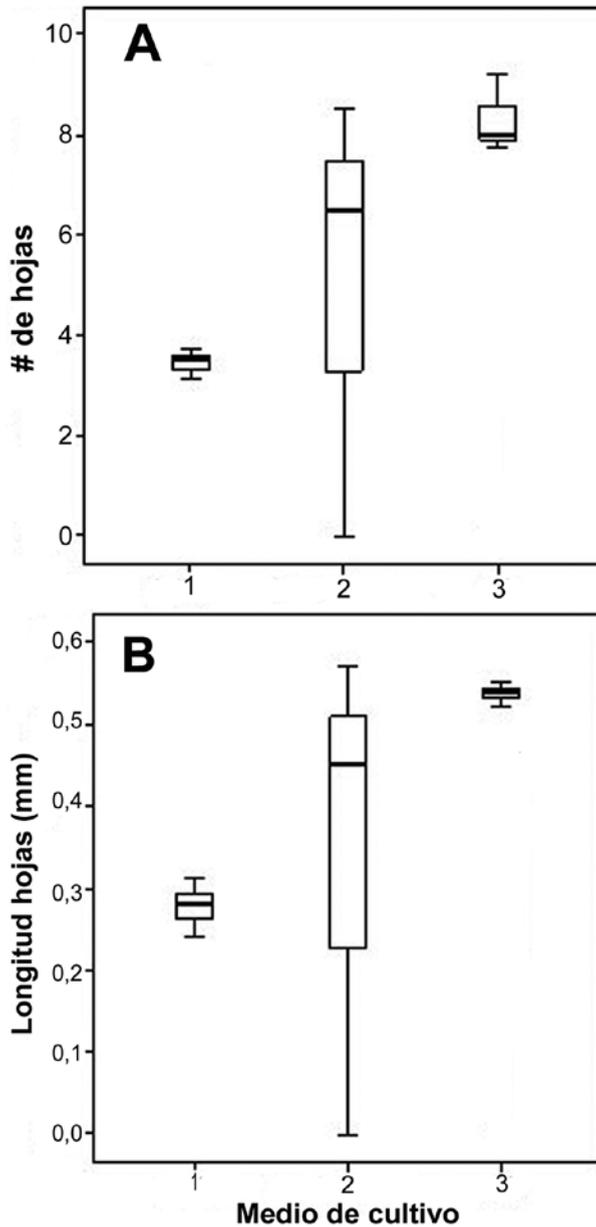
Para los indicadores de crecimiento y desarrollo evaluados, de acuerdo con el análisis de varianza realizado, no se presentaron diferencias significativas en *R. crispa* para la longitud de las hojas ni para el número de hojas ( $p \leq 0,05$ ) (figura 2); sin embargo, debido a las características de desarrollo observadas en las plantas creciendo en el medio MS con los macronutrientes a media

concentración, tales como altura, grosor del pseudotallo y vigor en general, se seleccionó este medio de cultivo como el más apropiado para el crecimiento y desarrollo de *R. crispa*. En *A. veitchii*, el análisis de varianza mostró que para el número de hojas desarrolladas se presentaron diferencias significativas (con un  $p \leq 0,05$ ) entre los medios con las sales MS (MS completo y MS con los macronutrientes a media concentración) y el medio exento de sales, siendo este último el medio donde se presentó menor número de hojas nuevas (figura 3A). Igualmente para la longitud de las hojas se encontró diferencia significativa, en este caso entre los tres tratamientos, siendo el medio MS con los macronutrientes a media concentración el que logró el mayor valor promedio, seguido de MS completo y con el menor valor promedio el medio exento de sales (figura 3B).

**Sobrevivencia.** Para este indicador se encontró que *A. veitchii*, pasados 90 días de germinada la primera semilla, alcanzó porcentajes de sobrevivencia del 85% en el medio exento de sales, del 84% en MS completo y del 91% en el medio MS con los macronutrientes a media concentración; por el contrario, *R. crispa* presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia en el medio exento de sales, 80%, en MS completo se obtuvo solo el 5,5% y en el medio MS con los macronutrientes a media concentración fue de 40% (figura 4).

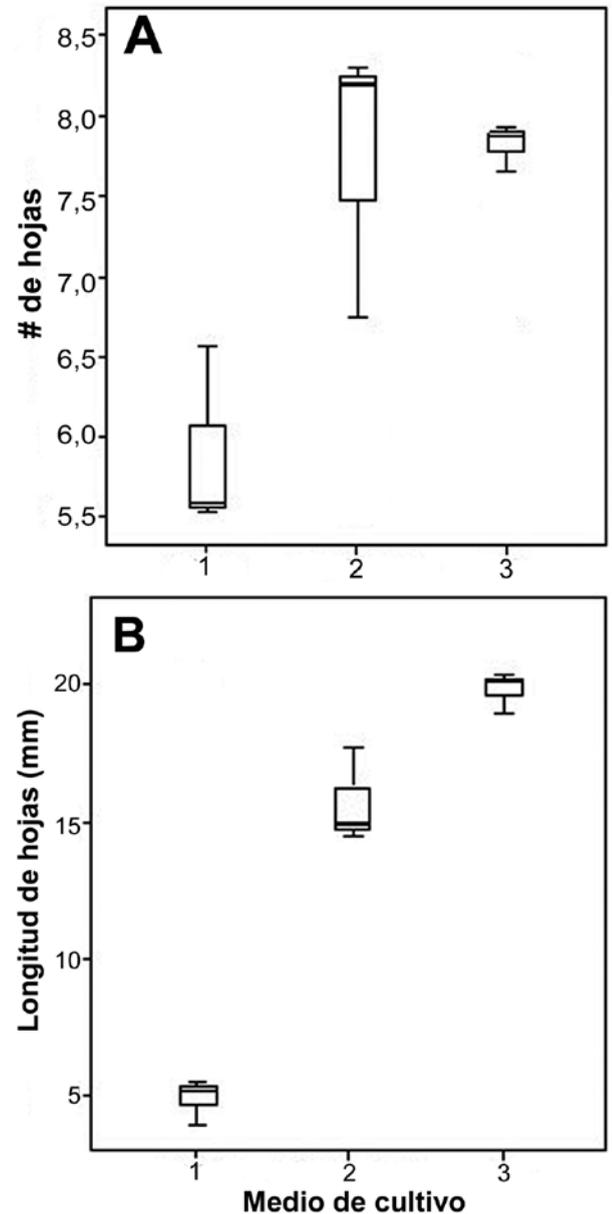
**Explantos, medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la respuesta organogénica o embriogénica de *A. veitchii* y *R. crispa*.** El propósito de este experimento fue determinar la respuesta in vitro de yemas apicales y porciones de hojas de vitroplantas y plantas de campo de las dos especies en estudio.

En los ensayos realizados con las porciones de hojas de las plantas de campo, no se presentó ningún tipo de respuesta (organogénica o embriogénica) a los diferentes tratamientos evaluados; la mayoría de explantes pasados 60 días



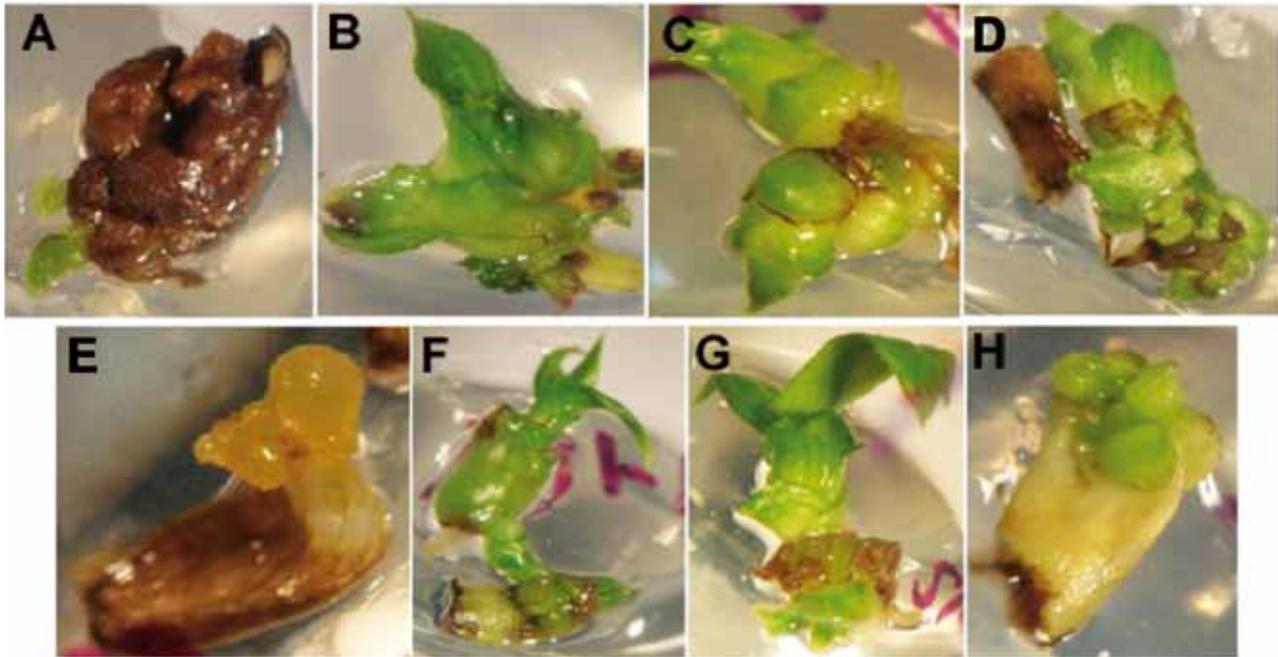
**Figura 2.** Efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo en *R. crisper* sobre: **A)** el número de hojas; y **B)** la longitud de las hojas (*Medios:* 1 = agar-agua; 2 = MS; 3 = sales MS con los macronutrientes a media concentración)

permanecieron sin cambios visibles y los restantes se tornaron cloróticos. Por el contrario, las yemas apicales y las bases de hojas de las vitroplantas obtenidas a partir de semillas, presentaron diversas respuestas a los tratamientos aplicados. Las respuestas obtenidas fueron agrupadas en las siguientes categorías: **A)** mul-



**Figura 3.** Efecto de la concentración de sales en el medio de cultivo en *A. veitchii* sobre: **A)** el número de hojas; y **B)** la longitud de las hojas (*Medios:* 1 = agar-agua; 2 = MS; 3 = sales MS con los macronutrientes a media concentración)

tiyema con brotes malformados y presencia de callo; **B)** multiyemas más brotes malformados; **C)** solo brotes malformados; **D)** solo multiyema; **E)** solo callo; **F)** desarrollo de la yema apical y brotes adventicios; **G)** brotes adventicios desarrollados, y **H)** brotes adventicios sin desarrollar (figura 5).



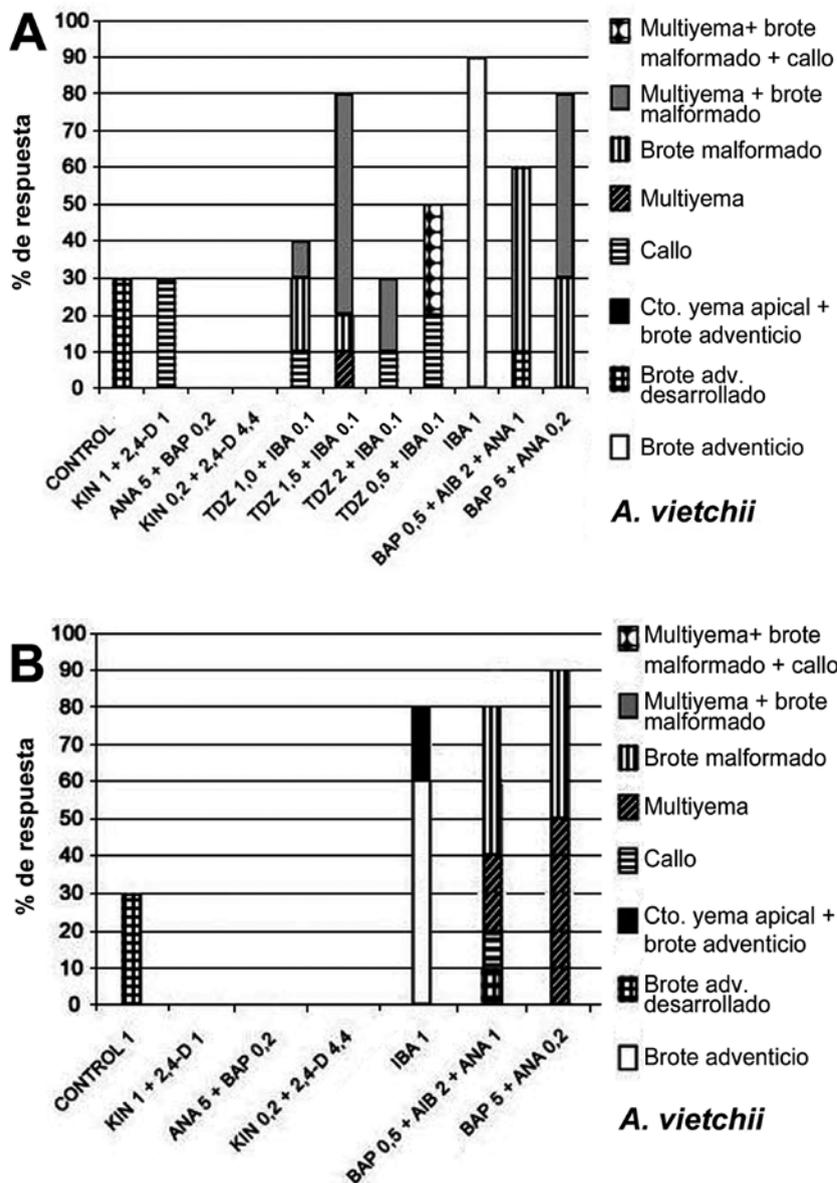
**Figura 5.** Respuestas obtenidas utilizando explantes provenientes de vitroplantas en *A. veitchii*: **A)** multiyema con brotes malformados y presencia de callo; **B)** multiyemas más brotes malformados; **C)** solo brotes malformados; **D)** solo multiyema; **E)** solo callo; **F)** desarrollo de la yema apical y brotes adventicios; **G)** brotes adventicios desarrollados, y **H)** brotes adventicios sin desarrollar

**Yemas apicales de *A. veitchii*.** En este explante, en el medio MS con las sales completas, 60 días después de la siembra se obtuvieron en el medio suplementado con **IBA** (1 mg/l) brotes adventicios en el 90% de los explantes, para el tratamiento con **BAP** (0,5 mg/l) + **AIB** (2 mg/l) + **ANA** (1 mg/l), se presentaron brotes malformados en el 50%, y en la combinación **BAP** (5 mg/l) + **ANA** (0,2 mg/l) se obtuvieron brotes malformados en el 30% de los explantes y en el 50% multiyemas + brotes malformados (figura 6A). En el medio suplementado con **KIN** (1 mg/l) + **2,4-D** (1 mg/l) se formó un callo compacto de color café en el 30% de los explantes.

En los medios de cultivo con las sales MS con los macronutrientes a media concentración, los explantes sembrados en el medio suplementado con **IBA** (1 mg/l) presentaron brotes adventicios (en el 60%) y crecimiento de la yema apical más brotes adventicios (en el 20%). En el me-

dio suplementado con **BAP** (0,5 mg/l) + **AIB** (2 mg/l) + **ANA** (1 mg/l) se obtuvo en el 40% brotes malformados y en el 20% multiyemas, además bajos porcentajes de callo y de brotes adventicios. Para el medio suplementado con **BAP** (5 mg/l) + **ANA** (0,2 mg/l) se encontró en el 50% de explantes formación de multiyemas y en el 40% brotes malformados (figura 6 B). Con las combinaciones de reguladores **KIN** (1 mg/l) + **2,4-D** (1 mg/l), **KIN** (0,2 mg/l) + **2,4-D** (4,4 mg/l) y **ANA** (5 mg/l) + **BAP** (0,2 mg/l) no se presentó ningún tipo de respuesta.

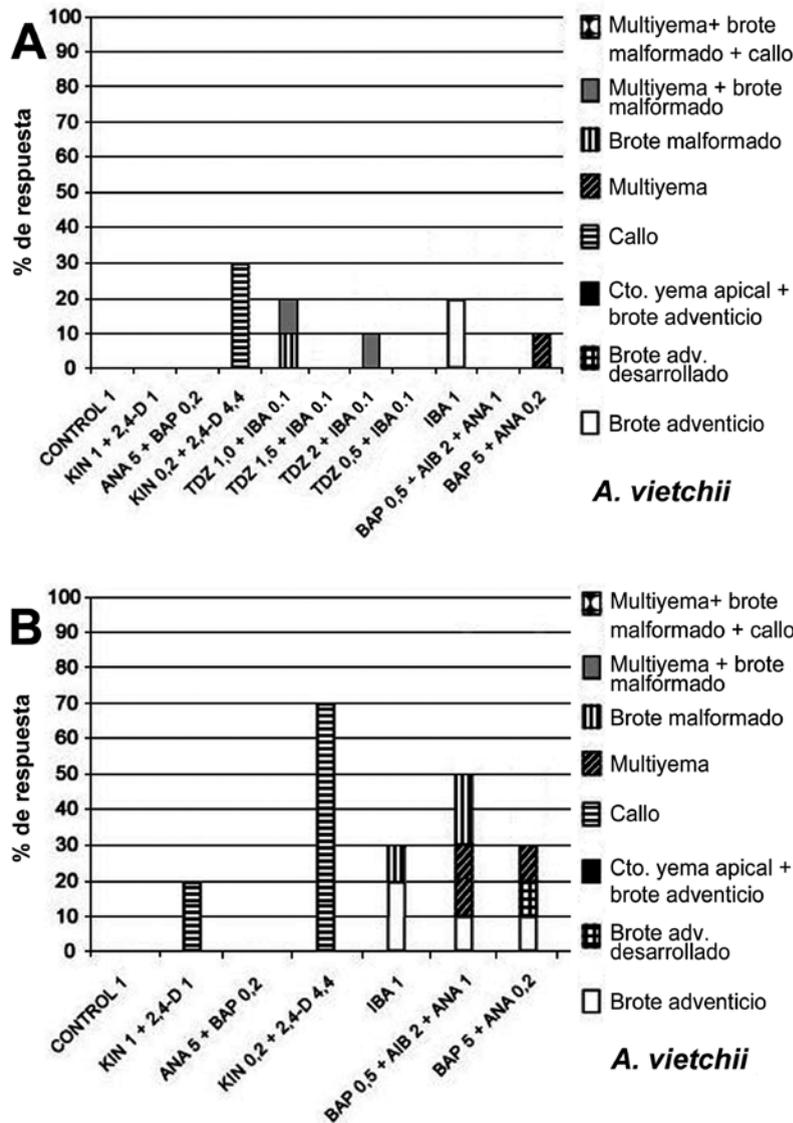
**Bases de hojas de *A. veitchii*.** Para este tipo de explante, en los medios de cultivo con las sales MS con los macronutrientes a media concentración, 60 días después de la siembra, se encontró que en el medio suplementado con **IBA** (1 mg/l), se desarrollaron brotes adventicios y brotes malformados en el 20 y 10% de los explantes respectivamente. Para la combinación



**Figura 6.** Respuestas de las yemas apicales de *A. vietchii* a diferentes combinaciones y reguladores de crecimiento en: **A)** medio MS con las sales completas; y **B)** sales MS con los macronutrientes a media concentración

**BAP** (0,5 mg/l) + **AIB** (2 mg/l) + **ANA** (1 mg/l) se presentaron en el 10% brotes adventicios, en el 20% multiyemas y en otro 20% brotes malformados. El tratamiento con **BAP** (5 mg/l) + **ANA** (0,2 mg/l), presentó brotes adventicios sin desarrollo, brotes adventicios desarrollados y multiyemas en el 10% de los explantes, respectivamente. Por otro lado en el medio que se suplementó con **KIN** (1 mg/l) + **2,4-D** (1 mg/l),

se observó un callo compacto de color amarillo en el 20% de los explantes; esta respuesta se presentó igualmente en el 70% de los explantes sembrados en los medios suplementados con **KIN** (0,2 mg/l) + **2,4-D** (4,4 mg/l) (figura 7). En esta última combinación de reguladores, cuando fueron adicionados al medio con las sales MS completas, solo se presentó la formación de este tipo de callo en el 30% de los explantes.



**Figura 7.** Respuestas de las bases de las hojas de *A. vietchii* a diferentes combinaciones y reguladores de crecimiento en: **A)** medio MS con las sales completas; y **B)** sales MS con los macronutrientes a media concentración

Cuando se utilizó el medio de cultivo basal MS con sales completas, las principales respuestas fueron la formación de brotes adventicios, multiyemas y brotes malformados, las cuales no superaron el 20 y el 10% de los explantes, respectivamente (figura 7A).

En general, en las bases de las hojas a partir de los 8 días de cultivo se inició la formación de puntos verdes que condujeron a la formación de los brotes adventicios (figura 5H).

**Yemas apicales de *R. crisper*.** En el tratamiento control con las sales MS completas solamente se presentó, en el 10% de los explantes, brote adventicio. No se presentó respuesta en los demás explantes, ni en los demás tratamientos evaluados.

**Bases de hojas de *R. crisper*.** En esta especie, el único resultado obtenido se presentó con la combinación hormonal **KIN** (0,2 mg/l) + **2,4-D** (4,4 mg/l) y las sales MS completas, con el 20% de callo amarillo compacto.

## DISCUSIÓN

Para el establecimiento in vitro de plantas, el tipo de contaminación y el origen (exógeno o endógeno) son cruciales; esto es particularmente importante cuando se trata de especies amenazadas, para las cuales la fuente de material es a menudo limitada y usualmente localizada en el bosque (Sarasan et al. 2006). No obstante en este trabajo, el método de desinfección aplicado permitió eliminar la contaminación y establecer exitosamente las porciones de hojas y semillas de las especies estudiadas.

**Efecto del medio de cultivo sobre los porcentajes de germinación; sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de las plántulas de *A. veitchii* y *R. crispa*.** Los altos porcentajes de germinación encontrados en las dos especies y en los tres medios de cultivo evaluados, indican la baja exigencia en requerimientos nutricionales especiales para esta respuesta, lo que coincide con lo descrito por Cortizo et al. (2007) en las especies de bromelias endémicas *Orthophytum mucugense* y *Neoregelia mucugensis*.

Es conocido que la viabilidad de las semillas es afectada por factores endógenos, entre ellos el genotipo, y entre otros factores externos, el tiempo y condiciones de almacenamiento (Winkler et al. 2005). Benzing (1990) afirmó que las semillas de las plantas epífitas no forman banco de semillas debido a los requerimientos de humedad y sustrato específicos. Teniendo en cuenta lo anterior es importante resaltar que en este trabajo el almacenamiento de las semillas se realizó a una temperatura de 10 °C y el tiempo bajo estas condiciones no superó los tres meses, factores que pudieron favorecer la viabilidad y por ende el proceso de germinación.

Los indicadores de crecimiento y desarrollo en *R. crispa* no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los medios evaluados,

sin embargo presentaron un mejor desarrollo en el medio MS con los macronutrientes a media concentración. En *A. veitchii*, se presentaron diferencias significativas, con los valores más altos en los medios basales MS y MS a la mitad, esta respuesta puede deberse a mayores requerimientos de minerales y fuente de carbono en la etapa de formación y desarrollo de nuevas hojas y puntos de crecimiento activos. Por el contrario, la sobrevivencia de las plántulas presentó un patrón de comportamiento donde el mayor porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *R. crispa* fue del 80% en el medio exento de sales y para *A. veitchii* correspondió al 91% en el medio MS a la mitad. Estos resultados coinciden además con lo descrito por Droste et al. (2005), quienes encontraron mayores tasas de sobrevivencia de plántulas de *Tillandsioide*, utilizando las sales MS con los macronutrientes a media concentración y a la cuarta parte de su concentración.

Las especies en estudio pertenecen a dos grupos que difieren entre sí por sus características morfológicas; una de ellas, *A. veitchii*, conocida como tipo tanque, se encuentra distribuida a través de tierras bajas y áreas montañosas, donde la lluvia es abundante y la humedad es alta; en esta especie se ha encontrado que el agua que recoge contiene detritus y minerales disueltos que sirven para su propia nutrición; y *R. crispa*, conocida como tipo atmosférica, predomina en las tierras bajas, adaptadas a climas secos (Méndez 1995). En ambas especies las hojas están cubiertas por tricomas epidérmicos, los cuales son importantes en la absorción de agua, aminoácidos, y humedad (Nievolá y Mercier 1996, Nyman et al. 1987), por ende las raíces han perdido esa función y parece que solo sirven para el anclaje (Benzing 1990), ganando independencia de sus sustratos y adquiriendo la capacidad de colonizar hábitats pobres en nutrientes (Méndez 1995); debido a esto, es muy probable que estas especies sean sensibles a las

concentraciones de sales presentes en el medio MS cuando permanecen por periodos largos. En este ensayo el efecto negativo de las sales MS completas sobre la sobrevivencia fue más marcado para *R. crispata* ya que la sobrevivencia fue solo del 5%.

Cascante et al. (2008) señalan que el desarrollo y la sobrevivencia de las plántulas en el bosque puede ser afectado por el sustrato, lo cual es una consecuencia de las diferentes capacidades de absorción de agua y disponibilidad de esta, además de la exposición a la luz entre otros factores. Winkler et al. (2005) encontraron que las semillas de cuatro especies de *Tillandsia* expuestas en el exterior de la copa del bosque mesófilo de montaña tardaron más tiempo en germinar que aquellas semillas colocadas en el interior; asimismo, Benzing (1978, 1981) encontró diferencias en el porcentaje de germinación de *Tillandsia circinnata*, las semillas alcanzaron solo el 4% cuando fueron sembradas en campo, incrementándose a el 35% cuando fueron mantenidas en invernadero, donde las condiciones pueden ser semicontroladas. Por otro lado, Duarte et al. (2009) afirmaron que cuando la siembra de semillas de bromelias se realiza in vitro se puede alcanzar hasta el 100% de germinación.

Teniendo en cuenta lo anterior y considerando los resultados en el presente estudio, la propagación in vitro a partir de semillas puede contribuir a restablecer con mayor eficiencia las poblaciones en el bosque de las especies *A. veitchii* y *R. crispata*.

**Explantos, medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la respuesta organogénica o embriogénica de *A. veitchii* y *R. crispata*.** Una vez iniciado el cultivo in vitro, la inducción y multiplicación de brotes puede ser difícil para algunas especies, particularmente especies maderables. Muchas especies tienen requerimientos in vitro específicos para la multiplicación y

por lo tanto se deben evaluar variaciones a las formulaciones existentes. En general, los requerimientos en sales minerales varían de un grupo de plantas a otro. De igual manera reguladores de crecimiento específicos u otros suplementos en muchos casos son requeridos para incrementar la regeneración y crecimiento.

Cuando se utilizaron como explantes porciones de hoja de plantas de campo, no se presentó ningún tipo de respuesta (organogénica o embriogénica), ni cambios visibles en los diferentes tratamientos evaluados. Aunque es conocido que el tejido joven presenta un potencial importante para la rediferenciación in vitro, las plantas madres provenientes de campo estaban en etapas de desarrollo avanzado, incluso algunas en etapa reproductiva, lo cual pudo afectar la respuesta in vitro y como lo describe Jiménez (1998), la edad fisiológica de la planta donadora tiene un rol importante en la determinación de la respuesta; los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo.

Por otro lado, aunque se tomaron las porciones cercanas a la base de las hojas más jóvenes, no se utilizó la zona basal que queda en contacto con el eje de la zona meristemática, ya que para conseguirlo era necesario deshojar completamente la planta, lo que implicaba sacrificarla, reduciendo drásticamente la cantidad de plantas fuente de explantes, la cual era limitada y como se explicó antes, traídas directamente del bosque. La zona basal de las hojas de las monocotiledóneas y especialmente de las bromelias, contienen elementos vasculares con células competentes para la rediferenciación cuando son activadas por señales reguladoras (Alves et al. 2006); además, es un tejido recientemente desarrollado con células en rápida división que favorecen la morfogénesis en el cultivo de tejidos. El uso de esta zona foliar con resultados exitosos ha sido reportado para diferentes especies (Alves et al.

2006, Firoozabady y Moy 2004, Hamasaki et al. 2005, Pompelli y Guerra 2004).

Recientemente, Smythe (2008) señala que las bromelias presentan dos tipos principales de meristemas, el más conocido, el meristemo apical donde se forman las hojas, tallos y flores nuevas, y el segundo, el que está en la punta de la raíz; pero describe además otra área meristemática, la cual siempre se ha pasado por alto, aquella que es depositada por el meristemo apical a medida que este crece; esta zona es conocida como meristemo foliar intercalar. Este autor, en un experimento realizado, encontró crecimiento de brotes desde la parte inferior exterior de una hoja de bromelia y no del interior de la axila de esta, corroborando la existencia de este meristema.

**Yemas apicales de *A. veitchii*.** Los mayores porcentajes de respuesta organogénica en las diferentes categorías, alcanzados en este explante, se deben al alto potencial de rediferenciación ya que este contiene el meristema apical vegetativo, el cual por sus características y tipo de células, le permite alcanzar mayor índice de regeneración.

En el medio basal MS completo y en el medio MS con los macronutrientes a media concentración, la formación de brotes adventicios en respuesta al tratamiento control permite predecir acerca del contenido endógeno de citoquininas en esta especie y en este tejido, indicando que es mayor respecto al contenido de auxina, lo cual está de acuerdo con lo que se ha denominado el modelo de Skoog-Miller de la organogénesis, *la diferenciación de yemas vegetativas (caulogénesis) es promovida por balances auxina/citoquinina, favorables a las citoquininas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (rizogénesis)* (Segura 2008).

Por otro lado, al comparar la respuesta del tratamiento control con la obtenida en el medio suplementado con **IBA** 1 mg/l, se encontró que

la combinación de la auxina exógena con la citoquinina endógena potenció la respuesta al desarrollo de brotes en estos explantes en el 90 y 60% (MS completo y MS con los macronutrientes a media concentración, respectivamente). Saucedo y Ramos (2008) sugieren que la adición de auxina al medio de multiplicación puede incidir directamente en el número de brotes ya que cuando el balance citoquinina-auxina está a favor de las citoquininas, los brotes no se elongan, se inhibe el enraizamiento y se estimula la brotación.

A partir de lo descrito anteriormente, la presencia de multiyemas y brotes malformados en los medios suplementados con **BAP** (5 mg/l) en combinación con **ANA** (0,2 mg/l) y con **BAP** (0,5 mg/l) + **AIB** (2 mg/l) + **ANA** (1 mg/l), se debe probablemente a la concentración de **BAP** en el primer tratamiento y a un balance inadecuado entre los reguladores endógenos y exógenos en el segundo. Aunque estas combinaciones de reguladores fueron utilizadas en la propagación clonal in vitro de *Ananas comosus* (Saucedo y Ramos 2008), en este trabajo fue clara la influencia del genotipo de *A. veitchii* en la respuesta a la morfogénesis in vitro.

En el mismo sentido, cuando se usaron combinaciones de **AIB** (0,1 mg/l) con **TDZ** (0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 mg/l), se obtuvieron gran cantidad de brotes adventicios malformados, diferentes tipos de callos y yemas múltiples, en algunos casos, en un mismo explante. Estas variadas respuestas coinciden con lo descrito por Firoozabady y Moy (2004), no obstante las malformaciones en los brotes pueden explicarse por las concentraciones de **TDZ** evaluadas, las cuales podrían ser consideradas altas de acuerdo con lo reportado por Duarte et al. (2009), quienes encontraron que plántulas de *Nidularium fulgens*, (bromelia nativa de Brasil), no sobrevivieron a concentraciones de **TDZ** de 0,05 y 0,1 mg/l en ausencia o con bajas concentraciones de **ANA**.

En contraste, Avico et al. (2006), describen la diferenciación in vitro de yemas de *Pseudoananas sangenarius* utilizando hojas de 1 cm cultivadas en MS suplementado con **TDZ** (3 mg/l). Es sabido que este compuesto no solo estimula la producción de brotes axilares, sino también la formación de callo y la regeneración de brotes (Huetteman y Preece 1993), promueve la síntesis y acumulación de purina e igualmente puede alterar el metabolismo de las citoquininas al incrementar los niveles endógenos de la hormona por la inhibición de la citoquinina oxidasa (Murthy et al. 1998).

Concentraciones elevadas de citoquininas pueden inducir la formación de yemas adventicias, no siendo las más adecuadas para una propagación clonal; no obstante, la producción de estas puede ser una vía de propagación de genotipos superiores (Pickens et al. 2006) y de conservación de mayor diversidad. Específicamente para el **BAP**, se ha encontrado que concentraciones superiores a 3 mg/l pueden causar vitrificación de los tejidos (Gürel y Gülsen 1998). Almeida et al. (2002) trabajando con *Ananas comosus* encontraron que concentraciones de 4 o 5 mg/l de **BAP** indujeron alta tasa de mortalidad de los explantes.

Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos en este estudio, es factible obtener gran cantidad de brotes con desarrollo normal, con el uso de bajas concentraciones de **TDZ** (menores de 0,5 mg/l) u otras citoquininas, solas o con bajas concentraciones de auxina.

**Bases de hojas de *A. veitchii*.** Para este explante, aunque la respuesta fue menor que la alcanzada para las yemas apicales, se logró la formación de brotes adventicios y multiyemas en diferentes tratamientos, resultado relevante para fines de propagación.

En los medios de cultivo suplementados con **BAP** (0,5 mg/l) + **AIB** (2 mg/l) + **ANA** (1 mg/l) y con

**BAP** (5 mg/l) + **ANA** (0,2 mg/l) se presentaron diferencias en el tipo y porcentaje de respuesta entre los tratamientos con sales completas y a la mitad de la concentración, sugiriendo que la cantidad de sales tuvo un marcado efecto en la respuesta de las bases de hojas de *A. veitchii*. Niedz y Evens (2007) afirmaron que el crecimiento de los tejidos y la extensión y calidad de la respuesta morfogénica está fuertemente influenciada por el tipo y concentración de nutrientes. Específicamente en bromelias, Kanashiro et al. (2009) describieron el efecto de la concentración de calcio en la producción in vitro de masa fresca y seca en plántulas de *Aechmea blanchetiana*. De otro lado, Mercier y Barbante (1998) y Mercier et al. (1997, 2003) encontraron que el balance endógeno auxina/citoquinina puede cambiar drásticamente dependiendo de la fuente de nitrógeno y de las diferencias genotípicas en la utilización de este, las cuales dependen del hábitat de crecimiento de las bromelias.

Lo anterior puede explicar igualmente la respuesta obtenida en los medios suplementados con **KIN** (1 mg/l) + **2,4-D** (1 mg/l) y con **KIN** (0,215 mg/l) + **2,4-D** (4,42 mg/l), donde se originó alrededor de la base de las hojas, en el 20 y 70% de los explantes respectivamente, callo nodular amarillo y compacto, similar al obtenido por Alves et al. (2006) en *Vriesea reitzii*. En esta última combinación de reguladores de crecimiento con las sales MS completas se obtuvo solo el 30% de los explantes este tipo de callo.

**Yemas apicales y bases de hojas de *R. crispa*.**

La baja respuesta de esta especie a los diferentes tratamientos evaluados puede atribuirse al estado temprano de desarrollo de la planta in vitro de la cual fueron tomados los explantes, ya que este es un factor que influye directamente en la respuesta. Pickens et al. (2006), en trabajo realizado con *Tillandsia eizii*, encontraron que la producción de brotes en los explantes (hojas)

de plántulas de 0 y 3 semanas de germinadas disminuyó y solo ocurrió hasta después de 16 a 20 semanas, además la mayoría de esas yemas tuvieron el crecimiento limitado y poca elongación y desarrollo. También al tamaño del explante; si se tiene en cuenta que el tamaño de las plántulas de *R. crispera* oscila entre 3 y 12 cm, las bases de las hojas y yemas apicales a ser usadas como explantes fueron de menos de 3 x 3 mm. Se ha postulado como regla general que en la medida que el explante es más pequeño, menor es su capacidad de supervivencia, lo que se explica si se tiene en cuenta que menor número de células son las que deben asumir el crecimiento y que el estrés de separación del explante es mayor cuando es más pequeño (Montoya 1991). Los resultados obtenidos en esta especie coinciden con lo descrito por Firoozabady y Moy (2004); estos autores usaron bases de hojas de *Ananas comosus* para inducir organogénesis o embriogénesis, y encontraron que los explantes menores de 3 x 3 mm murieron y los mayores de 7 mm crecieron sin producir tejidos organizados o rediferenciados.

## CONCLUSIONES

A pesar de la importancia ecológica, cultural y económica de muchas especies de bromelias, en nuestro país son escasos los trabajos enfocados a la búsqueda de alternativas de conservación para esta familia de plantas. Los resultados de este trabajo demuestran que la germinación in vitro de las semillas de *A. veitchii* y *R. crispera* no depende de la concentración de sales MS en el medio de cultivo; el crecimiento y desarrollo de las plántulas se ve favorecido por las sales a la mitad de la concentración, sin embargo la sobrevivencia de *R. crispera* se reduce a medida que incrementa la concentración de sales en el medio. Adicionalmente se reporta, a partir de yemas apicales y bases de hojas de plántulas in vitro, el crecimiento de las yemas y la formación de brotes axilares y adventicios para *A. veitchii*,

los cuales no presentaron malformaciones en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento y con bajas concentraciones de IBA. Aunque se puede establecer y lograr el crecimiento in vitro de *R. crispera*, a partir de semillas, la respuesta de los explantes a los tratamientos evaluados fue incipiente, lo que lleva a recomendar evaluar el efecto del estado de desarrollo, tamaño del explante y hábitat de crecimiento, entre otros parámetros sobre la respuesta in vitro de esta especie. La viabilidad de germinar y multiplicar in vitro estas especies es el punto de partida para la conservación in vitro de gemoplasma.

## AGRADECIMIENTOS

Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto.

## REFERENCIAS

- Almeida W, Santana G, Pinheiro A, Pereira M. 2002. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura (Jaboticabal)*, 24 (2): 296-300.
- Alves G, Vesco L, Guerra M. 2006. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*, 110: 204-207.
- Andrade F, Demattê M. 1999. Estudo sobre produção e comercialização de Bromélias nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental (Campinas)*, 5(2): 97-110.
- Avico EL, Rey HY, Mroginski LA. 2006. Regeneración de múltiples yemas a partir de hojas de *Pseudoananas saggenarius*. Resumen: A-027. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes, Argentina. Fecha de acceso: 08 de junio de 2011. Disponible en: <<http://www.fundevap.org.br/Downloads/Bromeliaceae/Brom%E9lias%20-%20Import%E2ncia%20Ecol%C3gica%20e%20Diversidade.pdf>>.
- Benzing DH. 1978. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in Southern Florida. *Selbyana*, 5 (1): 95-106.
- Benzing DH. 1981. The population dynamics of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae): cypress crown colonies in southern Florida. *Selbyana*, 5: 256-263.

- Benzing DH. 1990. Vascular epiphytes. General biology and related biota. Cambridge: Cambridge University Press. p. 354.
- Betancur J, García N. 2006. Las Bromelias. En: García N, Galeano G, editores. Libro rojo de plantas de Colombia. Vol. 3: Las bromelias, las labiadas y las pasifloras. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá (Colombia): Instituto Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. p. 51-384.
- Cascante A, Wolf J, Oostermeijer J, Nijs J. 2008. Establishment of epiphytic bromeliads in sucesional Tropical premontane forests in Costa Rica. *Biotropica*, 4 (4): 441-448.
- Corantioquia (Corporación Autónoma Regional) [Internet]. 2007. Corantioquia. Fecha de acceso: 20 de febrero de 2007. Disponible en: <<http://www.corantioquia.gov.co>>.
- Cortizo M, Cerqueira C, Lima A, Ferreira J, Cunha A. 2007. Establecimiento in vitro de *Orthoiphytum mucugense* y *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (2): 1101-1103.
- Cueva A, Espinosa C, Jordan M. 2006. Efficient in vitro multiplication of *Aechmea* "Little Harv" and *Tillandsia cyanea* Linden Ex K. Koch. *Propagation of Ornamental Plants*, 6 (4): 165-169.
- Davidson W. 1985. Manual práctico para el cuidado de las plantas de interior. Cómo mantener sus plantas sanas. Madrid (España): Ediciones Folio. p. x.
- Droste A, Machado da Silva A, Vieira A, Winck de Almeida J. 2005. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: Two vulnerable bromeliads native to Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (5): 717-722.
- Duarte P, Coelho V, Ferreira L, Paiva R, Pasqual M. 2009. In vitro propagation of *Nidularium fulgens* Lem. *Interciencia*, 34 (8): 593-596.
- Firoozabady E, Moy Y. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 40: 67-74.
- Gürel S, Gülsen S. 1998. The effects of IBA and BAP on in vitro shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). *Turkish Journal of Botany*, 22: 375-379.
- Hamasaki R, Purgatto E, Mercier H. 2005. Glutamine enhance competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated in vitro. *Brazil Journal Plant Physiology*, 17 (4): 383-389.
- Huetteman C, Preece J. 1993. Thidiazuron: A potent citoquinin for woody plants tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 105-119.
- Jevremović S, Radojević L. 2006. Establishment of efficient regeneration protocol from leaf explants of *Iris pumila* shoots cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, 108 (1): 100-103.
- Jiménez E. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. En: Pérez J, editor. Santa Clara (Cuba): Instituto de Biotecnología de Plantas. p. 45-56.
- Kanashiro S, Salvador R, Natal A, Demetrio V, Jocys T, Reis A. 2009. Effect of calcium on the in vitro growth of *Aechmea blanchetiana* (Backer) L. B. Smith Plantlets. *Journal of Plant Nutrition*, 32: 867-877.
- Lópes da Silva A, Henz E, Bortoluzzi E, Reichert L, Quoirin M. 2009. In vitro multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). *Iheringia (Série Botanica)*, 64 (2): 151-156.
- Melo TB. 1996. As bromélias no paisagismo. *Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias (Rio de Janeiro)*, 3: 3-7.
- Méndez V. 1995. Ecología de las bromelias epífitas. *Repertorio Científico (EUNED, San José, Costa Rica)*, 3 (2): 20-23.
- Mercier H, Barbante G. 1992. In vitro multiplication of *Vriesea fosteriana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30: 247-249.
- Mercier H, Barbante G. 1994. In vitro culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic forest. *Journal Bromeliad*, 44: 120-124.
- Mercier H, Barbante G. 1995. The importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana*, 16: 147-149.
- Mercier H, Barbante G. 1998. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 10: 225-228.
- Mercier H, Kerbauy G, Sotta B, Miginiac E. 1997. Effects of NO<sub>3</sub>, N, H and urea nutrition on endogenous levels of IAA and four cytokinins in two epiphytic bromeliads. *Plant, Cell and Environment*, 20: 387-392.
- Mercier H, Souza B, Kraus J, Mayumi R, Sorra B. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 15 (2): 107-112.
- Montoya L. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Medellín (Colombia): Universidad Nacional de Colombia. p. 77.
- Moreira BA, Lapa Wanderley MG, Vitorino da Cruz-Barros MA. 2006. Bromélias: Importância ecológica e diversidade, taxonomia e morfologia. Fecha de acceso: 18 de junio de 2011. Disponible en: <<http://www.fundevap.org.br/Downloads/Bromeliaceae/Brom%20E9lias%20-%20Import%20E2ncia%20Ecol%20F3gica%20e%20Diversidade.pdf>>.
- Murthy BN, Murch SJ, Saxena PK. 1998. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. In

- Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 34: 267-275.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth an bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Niedz R, Evens T. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In vitro Developmental Biology Plant*, 43: 370-381.
- Nievola CC, Mercier H. 1996. The importance of leaf and root systems in nitrate assimilation in *Vriesea fosteriana*. *Bromelia*, 3: 14-18.
- Nyman LP, Davis JP, O'Dell SJ, Arditti J, Stephens GC, Benzing DH. 1987. Active uptake of amino acids by leaves of an epiphytic vascular plant, *Tillandsia paucifolia* (Bromeliaceae). *Plant Physiology*, 83: 681-684.
- Pickens K, Wolf J, Affolter J, Wetzstein H. 2006. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 42: 348-353.
- Pompelli M, Guerra M. 2004. Ex situ conservation of *Dickia distachia* an endangered bromeliad from South Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4: 273-279.
- Roostika I, Mariska I. 2003. In vitro culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: Its utilization and prospect. *Buletin AgroBio*, 6 (1): 34-40.
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay M, Atherton M, Prendergast G, Rowntree J. 2006. Conservation in vitro of threatened plants: progress in the past decade. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant*, 42: 206-214.
- Saucedo S, Ramos L. 2008. Propagación clonal in vitro de piña *Ananas comusus* L. Merr variedades *Champaka* y *Hawaiiana*. Laboratorio de Biotecnología UTEQ. *Ciencia y Tecnología*, 1: 49-54.
- Segura J. 2008. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. En Azcon J, Talon M, editores. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2.<sup>a</sup> ed. Barcelona (España): McGraw-Hill. p. 349-376.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnoideae. Bromeliaceae. *Flora Neotropical* (The New York Botanical Garden. New York, U. S. A.), 14 (1): 1-658.
- Smythe R [Internet]. 2008. Believe it or not, but is all true. *Bromeliad Newsletter* (The Bromeliad Society of Queensland, Inc.), 42 (2): 5-7. Fecha de acceso: 10 de octubre de 2010. Disponible en: <[http://www.bromsqueensland.com/pdf/Mar-Apr\\_2008.pdf](http://www.bromsqueensland.com/pdf/Mar-Apr_2008.pdf)>.
- Vadillo G, Suni M, Cano A. 2004. Viabilidad y germinación de semillas de *Puya raimondii* Harms (Bromeliaceae). *Revista Peruana Biología*, 11 (1): 71-78.
- Winkler M, Hülber 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: 1039-1047.