

REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker POR ORGANOGÉNESIS DIRECTA

In vitro PLANT REGENERATION OF *Tillandsia viridiflora* (Beer) Baker BY DIRECT ORGANOGENESIS

Jonathan Márquez-Martínez¹, María Cristina Guadalupe López-Peralta^{1*}, Eleodoro Hernández-Meneses², Nicacio Cruz-Huerta³

³Genética. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (cristy@colpos.mx). ²Ingeniería en Agronomía, TecNM - Campus Región Sierra, Carretera Teapa-Tacotalpa Km 4.5, Francisco Javier Mina, Teapa, Tabasco. 86801.

RESUMEN

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker es una bromelia epífita endémica de México y la destrucción de su hábitat y comercio ilegal han propiciado su inserción como especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Para su aprovechamiento comercial como planta ornamental se requiere un sistema de propagación masiva. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son una opción para producir gran cantidad de plantas. Los objetivos de este estudio fueron determinar las condiciones óptimas para regenerar plantas *in vitro* por organogénesis directa y aclimatarlas. La organogénesis se evaluó en medio Murashige-Skoog (MS) con 6-bencilaminopurina (BAP, 0.0 y 8.8 μM) y ácido naftalenacético (ANA, 0.0 y 2.1 μM) a partir de plántulas *in vitro* germinadas en medio MS con 50% de la concentración de sales. Grupos de brotes se colocaron en medio MS con ácido giberélico (AG_3 , 0 y 5.77 μM) para promover el alargamiento. El enraizamiento de brotes se evaluó en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ANA (0.00 y 2.15 μM) y ácido indol-3-butírico (AIB) (0.00 y 2.15 μM). En la aclimatación se evaluaron dos alturas de planta y dos tipos de sustrato: turba+perlita (1:1) y corteza de pino (*Pinus*). El estudio se estableció en un diseño completamente al azar y los datos obtenidos se analizaron con ANDEVA; para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey. La germinación fue 82% a las cinco semanas. En la organogénesis se indujeron 10.4 brotes por explante con 6.65 μM de BAP y 0.5 μM de ANA y en la multiplicación se obtuvieron 13 brotes con 4.4 μM de BAP y 0.5 μM de ANA, ambos casos en 12 semanas. El alargamiento mayor (1.5 cm) de los brotes se indujo con 5.7 μM de ácido giberélico. El mayor número de raíces (2.4 raíces por planta) se indujo con 1.0 μM de

ABSTRACT

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker is an epiphytic bromeliad endemic to Mexico, and the destruction of its habitat and illegal trade have led to its inclusion in the list of endangered species in NOM-059-SEMARNAT-2010. For its commercial use as an ornamental plant, a massive propagation system is required. *In vitro* plant tissue culture techniques are an option for producing large numbers of plants. The objectives of this study were to determine the optimal conditions to regenerate plants *in vitro* by direct organogenesis and acclimatize them. Organogenesis was evaluated in Murashige-Skoog (MS) medium with 6-benzylaminopurine (BAP, 0.0 and 8.8 μM) and naphthaleneacetic acid (NAA, 0.0 and 2.1 μM) from *in vitro* seedlings germinated in MS medium with 50% of the salt concentration. Shoot groups were placed in MS medium with gibberellic acid (GA_3 , 0 and 5.77 μM) to promote elongation. Shoot rooting was evaluated in MS medium with 50% of the salt concentration added with NAA (0.00 and 2.15 μM) and indole-3-butyric acid (IBA) (0.00 and 2.15 μM). During acclimatization, we evaluated two plant heights and two types of substrates: peat + perlite (1:1) and pine bark (*Pinus*). We established a completely randomized design and the data obtained were analyzed with ANOVA; the Tukey test was used for the comparison of means. Germination was 82% in five weeks. In the organogenesis, 10.4 shoots were induced per explant with 6.65 μM of BAP and 0.5 μM of NAA, and the multiplication resulted in 13 shoots with 4.4 μM of BAP and 0.5 μM of NAA, both cases in 12 weeks. The largest elongation (1.5 cm) of the shoots occurred by adding 5.7 μM of gibberellic acid; and the highest number of roots (2.4 roots per plant) resulted from adding 1.0 μM NAA. In acclimatization, survival was 100% with 4.5 and 6.5 cm plants planted in peat+perlite and pine bark.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2019. Aprobado: noviembre, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 763-777. 2020.

ANA. En la aclimatación la supervivencia fue 100% con plantas de 4.5 y 6.5 cm plantadas en turba+perlita y corteza de pino.

Palabras clave: epífitas, conservación de especies vulnerables, bromelia endémica, micropropagación, *Tillandsia viridiflora*, morfogénesis.

INTRODUCCIÓN

La diversidad florística de México incluye especies de valores estéticos que requieren estudios para su conservación y aprovechamiento, y dentro de ellas destacan las bromeliáceas. La belleza de las bromelias se reconoce en el mundo y existen especies que se usan como plantas de ornato. El manejo agronómico de estas plantas solo se conoce parcialmente y esto limita la producción comercial de plantas que satisfaga la demanda creciente. La extracción de ejemplares de su ambiente natural y el comercio ilegal aumentan de modo considerable (Vázquez *et al.*, 2014). Las bromelias comercializadas en mercados locales de México se extraen de los bosques para usarlas como fibras, alimento, follaje, medicina y decoración. Además, la destrucción de su hábitat natural las ha convertido en plantas amenazadas y en peligro de extinción (Méndez *et al.*, 2011).

En el mundo existen aproximadamente 60 géneros de bromelias que incluyen 3170 especies (Sheu *et al.*, 2017). El género *Tillandsia* L. es el más grande de la familia bromeliaceae, agrupa 21.2% del total de especies donde 94.6% son epífitas (Zotz, 2013). En México se ubican 422 especies de las cuales 230 (54.5%) son endémicas (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018). Las especies de *Tillandsia* se pueden usar como fibras, forrajes, combustible, medicinas y plantas ornamentales (Méndez *et al.*, 2011). La NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye 21 especies de bromelias como amenazadas o protegidas o ambas de las cuales 81% son del género *Tillandsia*. Sin embargo, la mayoría de las especies requiere de protección especial porque necesitan hábitats específicos para sobrevivir (SEMARNAT, 2010).

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker es una bromelia nativa de México, la cual habita en bosques de pino-encino, bosques de encino, bosques tropicales subcaducifolios y bosques mesófilos de montaña; se encuentra en altitudes de 1000 a 1800 m y su periodo de floración es de julio a diciembre. *T. viridiflora* es una especie rara y muy escasa reportada para los estados

Key words: epiphytes, conservation of vulnerable species, endemic bromeliad, micropropagation, *Tillandsia viridiflora*, morphogenesis.

INTRODUCTION

The floristic diversity of Mexico includes species of aesthetic value that require studies for their conservation and use, and bromeliads stand out among them. The beauty of bromeliads is recognized worldwide, and there are species that are used as ornamental plants. The agronomic management of these plants is only partially known, limiting then the commercial production of plants to meet an increasing demand. The extraction of specimens from their natural environment and illegal trade are on the rise (Vázquez *et al.*, 2014). Bromeliads which are sold in local markets in Mexico are extracted from the forests for use as fibers, food, foliage, medicine and decoration. Furthermore, the destruction of their natural habitat has turned them into threatened and endangered plants (Méndez *et al.*, 2011).

There are in the world approximately 60 genera of bromeliads that include 3170 species (Sheu *et al.*, 2017). The *Tillandsia* L. genus is the largest of the bromeliaceae family, with 21.2%, of which 94.6% are epiphytes (Zotz, 2013). In Mexico, there are 422 species of which 230 (54.5%) are endemic (Espejo-Serna and López-Ferrari, 2018). *Tillandsia* species can be used as fibers, fodder, fuel, medicine, and ornamental plants (Méndez *et al.*, 2011). The Mexican regulation code NOM-059-SEMARNAT-2010 includes 21 species of bromeliads as threatened or protected or both, 81% of them are in the *Tillandsia* genus. However, most species require special protection because they need specific habitats to survive (SEMARNAT, 2010).

Tillandsia viridiflora (Beer) Baker is a bromeliad native to Mexico that grows in pine-oak forests, oak forests, tropical subdeciduous forests and mountain mesophilic forests. It is found at altitudes of 1000 to 1800 m and its blooming period is from July to December. *T. viridiflora* is a rare and very scarce species found in the states of Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro and Veracruz (Espejo-Serna and López-Ferrari, 2018). The marketing of this bromeliad is illegal, as is the case of most bromeliad species in Mexico. There are no domestication

de Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro y Veracruz (Espejo-Serna y López-Ferrari, 2018). El comercio de esta bromelia es ilegal, al igual que en la mayoría de especies de bromeliáceas de México. Para esta especie silvestre no existen estudios de domesticación ni de cultivo. Los ejemplares comercializados como ornamentales son plantas silvestres que extraen de los bosques. Esta forma ilegal de aprovechamiento reduce las poblaciones naturales de forma irreversible.

En la actualidad no hay estudios sobre la propagación convencional o *in vitro* de *T. viridiflora*. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ofrece una alternativa de propagación masiva. Estas técnicas, junto con nuevos desarrollos biotecnológicos, han contribuido a la propagación rápida y al rescate, conservación y aprovechamiento de especies vegetales vulnerables o en peligro de extinción. Las técnicas *in vitro* permiten la regeneración de plantas a partir de explantes, incluidas las semillas. (Anis and Ahmad, 2016).

La conservación y el aprovechamiento comercial requieren de técnicas de propagación que contrarresten el saqueo de ejemplares de su ambiente natural (Lavor *et al.*, 2014). El objetivo de esta investigación fue determinar las condiciones óptimas para regenerar plantas de *T. viridiflora* por organogénesis directa a partir de plántulas germinadas *in vitro* y aclimatarlas a condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente de semillas y desinfección

Las semillas sanas y de tamaño uniforme se recolectaron de cápsulas de plantas adultas procedentes de poblaciones silvestres, y se lavaron con agua y jabón comercial (Roma®) en agitación continua por 5 min seguidos de enjuagues con agua del grifo hasta eliminar el jabón. La desinfección superficial se basó en el procedimiento reportado para *Vriesea heliconioides* por Hernández-Meneses *et al.* (2018).

Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo utilizado en la germinación y en las etapas de la organogénesis fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), ácido nicotínico (0.5 mg L⁻¹), HCl-piridoxina (0.5 mg L⁻¹), HCl-tiamina (0.1 mg L⁻¹), glicina (2.0 mg L⁻¹) y solidificado con agar-agar (MP Biomedicals, LLC®, 7.5 g L⁻¹). El pH se ajustó a 5.7

or cultivation studies on this wild species. The specimens marketed as ornamentals are wild plants that are extracted from the forests. This illegal form of exploitation reduces natural populations irreversibly.

There are currently no studies on the conventional or *in vitro* propagation of *T. viridiflora*. *In vitro* plant tissue culture offers an alternative for mass propagation. These techniques, along with new biotechnological developments, have contributed to the rapid spread and rescue, conservation and use of vulnerable or endangered plant species. *In vitro* techniques allow the regeneration of plants from explants, including seeds (Anis and Ahmad, 2016).

Conservation and commercial use require propagation techniques that counteract the looting of specimens from their natural environment (Lavor *et al.*, 2014). The objective of this research was to determine the optimal conditions to regenerate *T. viridiflora* plants by direct organogenesis from *in vitro* germinated seedlings and acclimatize them to greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

Seed source and disinfection

Healthy seeds of uniform size were collected from capsules of adult plants from wild populations; we washed them with tap water and commercial soap (Roma®) in continuous agitation for 5 min, then we rinsed them with tap water to remove the soap. Surface disinfection was based on the procedure reported for *Vriesea heliconioides* by Hernández-Meneses *et al.* (2018).

Culture medium and incubation conditions

The culture medium used in germination and in the stages of organogenesis was MS (Murashige and Skoog, 1962), added with sucrose (30 g L⁻¹), myo-inositol (100 mg L⁻¹), nicotinic acid (0.5 mg L⁻¹), HCl-pyridoxine (0.5 mg L⁻¹), HCl-thiamine (0.1 mg L⁻¹), and glycine (2.0 mg L⁻¹) and solidified with agar-agar (MP Biomedicals, LLC®, 7.5 g L⁻¹). The pH was adjusted to 5.7 with NaOH or HCl 1N on a potentiometer (Thermo Scientific® Model Orion 3 Star) before adding the agar. We sterilized by using a vertical autoclave (AESAs® 300) at 121 °C and 1.5 kg cm⁻² of pressure for 20 min. The cultures were incubated at 26±2 °C under photoperiod conditions of 16/8 h light/dark and light intensity of 45 µmol ms⁻¹ of cold white LED light.

con NaOH o HCl 1N en un potenciómetro (Thermo Scientific® Modelo Orion 3 Star) antes de agregar el agar. La esterilización se hizo en autoclave vertical (AESAs® 300) a 121 °C y 1.5 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Los cultivos se incubaron a 26±2 °C en condiciones de fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad e intensidad luminosa de 45 μmol m⁻²s⁻¹ de luz blanca fría LED.

Establecimiento *in vitro*

Semillas de ocho meses de edad se sembraron en medio MS con 50% de la concentración de sales para inducir la germinación *in vitro*; se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Durante las primeras cuatro semanas, cada tercer día, se cuantificó la germinación (%) así como el inicio y término de la misma (número de días), la aparición de la primera hoja (días) y la aparición del sistema radicular (días). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fueron 10 semillas sembradas en cada frasco de cultivo.

Regeneración de plantas por organogénesis directa

Inducción de brotes

Plántulas germinadas *in vitro* de 25 semanas de edad y de 2 cm de altura se usaron como explantes, se establecieron en medio MS con BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54, 6.65 y 8.87 μM) combinadas con ANA (0.0 y 0.5 μM), y se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Para evaluar las respuestas morfogénicas producidas por el BAP y ANA, en función del tiempo de exposición, se hicieron tres subcultivos a medio MS sin reguladores de crecimiento.

Cinco frascos con tres plántulas cada uno se transfirieron de los tratamientos de inducción a medio MS sin reguladores de crecimiento a las cuatro semanas, otro grupo de cinco frascos a las ocho semanas y un tercer grupo de cinco a las 12 semanas. Cada dos semanas, durante 12 semanas, se contabilizó la brotación (B, %; calculada por el número de explantes que formaron brotes) y el número de brotes por explante (BE). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres plántulas.

Multiplicación de brotes

Brotes de 1.2 cm de longitud se cultivaron en medio MS con BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54 y 6.65 μM) combinados con ANA (0.0 y 0.5 μM); se usaron frascos de vidrio de 45 mL de capacidad con 15 mL de medio. Las respuestas morfogénicas

In vitro establishment

We sowed eight-month-old seeds in MS medium with 50% of the salt concentration to induce *in vitro* germination; and used 45 mL glass flasks with 15 mL medium. During the first four weeks, every third day, we quantified germination (%), as well as its beginning and end (number of days); we recorded the appearance of the first leaf (days) and the root system (days). The experiment was established in a completely randomized design with 10 replicates per treatment, where the experimental unit comprised 10 seeds sown in each culture flask.

Plant regeneration by direct organogenesis

Shoot induction

In vitro germinated seedlings, 25 weeks old and 2 cm high were used as explants, and we established them in MS medium with BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54, 6.65 and 8.87 μM) combined with NAA (0.0 and 0.5 μM), using 45 mL glass flasks with 15 mL medium. To evaluate the morphogenic responses produced by BAP and NAA in terms of the exposure time, we prepared three subcultures in MS medium without growth regulators.

Five flasks with three seedlings each from the induction treatments were transferred to MS medium without plant growth regulators at four weeks, another group of five flasks at eight weeks and a third group of five at 12 weeks. Every two weeks, for 12 weeks, we calculated the shooting (B, %; calculated by the number of explants that formed shoots) and the number of shoots per explant (BE). We set the experiment using a completely randomized design with 15 replicates per treatment; the experimental unit was a culture flask with three seedlings.

Shoot multiplication

Shoots 1.2 cm in length were grown in MS medium with BAP (0.00, 2.21, 3.32, 4.43, 5.54 and 6.65 μM) combined with NAA (0.0 and 0.5 μM); 45 mL glass flasks with 15 mL medium were used. We evaluated the morphogenic responses promoted by BAP and NAA, in relation to the exposure time, at the end of two subcultures in MS medium without plant growth regulators. We transferred a group of five flasks with three shoots each from the multiplication treatments to medium without plant growth regulators at eight weeks, and another group of five at 12 weeks. The same variables of shoot induction were quantified. We established the experiment in a completely randomized design and 10 replicates per treatment; the experimental unit was a culture flask with three shoots.

promovidas por el BAP y ANA, en función del tiempo de exposición, se evaluaron al término de dos subcultivos a medio MS sin reguladores de crecimiento. Un grupo de cinco frascos con tres brotes cada uno se transfirió de los tratamientos de multiplicación a medio sin reguladores de crecimiento a las ocho semanas y otro grupo de cinco a las 12 semanas. Las mismas variables de la inducción de brotes se cuantificaron. El experimento se estableció en diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un frasco de cultivo con tres brotes.

Alargamiento de brotes

Grupos de brotes de 4 mm de longitud promedio, procedentes de la etapa de multiplicación, se cultivaron en medio MS con ácido giberélico (AG_3 ; 0, 1.44, 2.88, 4.33, 5.77 μM) para promover el alargamiento, y se usaron frascos de vidrio de 90 mL de capacidad con 30 mL de medio. Un subcultivo a los mismos tratamientos de AG_3 se hizo a las tres semanas, y a las seis semanas se cuantificó la longitud de brotes (cm) y el número de brotes por explante. El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un grupo de brotes establecido en cada frasco de cultivo.

Enraizamiento de plantas

Brotes de 1 cm de longitud se establecieron en medio MS con 50% de la concentración de sales adicionado con ANA (1.07, 2.15 μM), ácido indolbutírico (AIB; 1.07, 2.15 μM) y un tratamiento sin reguladores de crecimiento. Frascos de vidrio se usaron, de 90 mL de capacidad con 30 mL de medio. A las tres semanas se hizo un subcultivo a los mismos tratamientos y después de seis semanas se cuantificó el enraizamiento (%), calculado por el número de brotes que generaron raíces, el número de raíces por brote (RB) y la longitud de raíz (LR, cm). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fueron dos brotes por frasco de cultivo.

Aclimatación de plantas

Plantas enraizadas *in vitro* de 4.5 y 6.5 cm de altura se plantaron en dos tipos de sustrato: turba+perlita (1:1) y corteza de pino, y se usaron vasos de poliestireno expandido de 118 mL de capacidad con un domo del mismo material. Los riegos se hicieron cada semana con 50% de la concentración de sales del medio MS. Después de 11 semanas se cuantificó la supervivencia (%), altura de planta (AP, cm), longitud de raíz (LR, cm) y número de

Shoot elongation

We cultivated groups of shoots with an average length of 4 mm, from the multiplication stage, in MS medium with gibberellic acid (GA_3 ; 0, 1.44, 2.88, 4.33, 5.77 μM) to promote elongation, and utilized 90 mL glass flasks of 30 mL medium. We did a subculture with the same GA_3 treatments three weeks later, and at six weeks we registered the shoot length (cm) and the number of shoots per explant. The experiment was established with a completely randomized design and 15 replicates per treatment; the experimental unit was a group of shoots established in each culture flask.

Plant rooting

Shoots of 1 cm in length were established in MS medium with 50% of the salt concentration added with NAA (1.07, 2.15 μM), indole butyric acid (IBA; 1.07, 2.15 μM) and a treatment without plant growth regulators. We used 90 mL glass flasks with 30 mL medium. After three weeks, we prepared a subculture with the same treatments and after six weeks we estimated rooting (%), calculated by the number of shoots that generated roots, the number of roots per shoot (RB) and the root length (LR, cm). The experiment was established in a completely randomized design with 10 replicates per treatment; the experimental unit consisted of two shoots per culture flask.

Plant acclimatization

In vitro rooted plants 4.5 and 6.5 cm in height were planted in two types of substrate: peat + perlite (1:1) and pine bark, and used 118 mL expanded polystyrene cups with a dome-lid of the same material. Watering was made every week with 50% of the salt concentration of the MS medium. After 11 weeks, we recorded the survival (%), plant height (AP, cm), root length (LR, cm) and number of leaves (NH). The experiment was established in a completely randomized design with 20 replicates per treatment; the experimental unit consisted of a plant in each glass.

Statistical analysis

The data obtained in each experiment underwent analysis of variance with the SAS statistical package (SAS Institute, 2003), and the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used for the comparison of means. The percentage values were transformed with the square root of $Y + 0.5$.

hojas (NH). El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una planta en cada vaso.

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 con la raíz cuadrada de $Y + 0.5$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento y germinación *in vitro*

Después de 21 semanas del establecimiento *in vitro* no se observó contaminación; por lo tanto, el método de desinfección superficial de las semillas fue confiable. Los resultados coincidieron con los de *Tillandsia gardneri*, en la cual se obtuvo el 100% de semillas libres de contaminación al utilizar diferentes combinaciones de concentraciones de hipoclorito de sodio (10-50%) y tiempos de inmersión (5-15 min) (Pinto *et al.*, 2012).

La germinación *in vitro*, considerada como la emergencia de la radícula, se presentó entre los 15 y 35 d después de la siembra (Figura 1A). La emergencia de la primera hoja se observó a los 24 d y el sistema radical a los 71 d. En otras bromelias como *Aechmea blanchetiana* la germinación *in vitro* se presentó entre 5 y 10 d después de la siembra, para las semillas colocadas bajo luz, y hasta 15 d después las que estuvieron en oscuridad.

En *A. distichantha* la germinación inició a los 5 d después de la siembra y continuó hasta 40 d después para las semillas mantenidas bajo luz y oscuridad, respectivamente (Santa-Rosa *et al.*, 2013). Estas diferencias de germinación entre especies de bromelias se deben al grado de madurez de las semillas y las condiciones de luz (Silveira *et al.*, 2009). En nuestro estudio la germinación de *T. viridiflora* se obtuvo en condiciones de fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad.

La germinación de *T. viridiflora* fue 94%, un porcentaje similar a los consignados para otras especies de bromelias. En *Vriesea incurvata* la germinación *in vitro* fue 93.9% (Pulido-Rueda *et al.*, 2018) y en *Neoglaziovia variegata* la germinación fue de 80 a 100% (Silveira *et al.*, 2009). Las plántulas de *T. viridiflora*

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro establishment and germination

After 21 weeks of *in vitro* establishment, we observed no contamination; therefore, the surface seed disinfection method was reliable. The results coincided with those of *Tillandsia gardneri*, in which 100% contamination-free seeds resulted by using different combinations of sodium hypochlorite concentrations (10-50%) and immersion times (5-15 min) (Pinto *et al.*, 2012).

In vitro germination, considered as the emergence of the radicle, occurred between 15 and 35 d after sowing (Figure 1A). The emergence of the first leaf occurred at 24 d and the root system at 71 d. In other bromeliads such as *Aechmea blanchetiana*, *in vitro* germination of the seeds placed under light occurred between 5 and 10 d after sowing, and up to 15 d later those that were in darkness.

A. distichantha began germination 5 d after sowing and continued up to 40 d later, seeds kept under light and darkness, respectively (Santa-Rosa *et al.*, 2013). These differences in germination between bromeliad species are due to the degree of maturity of the seeds and light conditions (Silveira *et al.*, 2009). In our study, the germination of *T. viridiflora* occurred under photoperiod conditions of 16/8 h light/dark.

The germination of *T. viridiflora* was 94%, a percentage similar to those recorded for other species of bromeliads. In *Vriesea incurvata* the *in vitro* germination was 93.9% (Pulido-Rueda *et al.*, 2018), and in *Neoglaziovia variegata* germination was 80 to 100% (Silveira *et al.*, 2009). *T. viridiflora* seedlings reached an average size of 16.8 mm with 2.1 roots after 21 weeks of *in vitro* establishment. This response demonstrated the slow growth of bromeliads and there are no reports on this in the literature; hence we evaluated it in the present study.

The capsules of *T. viridiflora* contained an average of 500 seeds, and the weight of 1000 seeds, without the feathery appendix, was 400 mg. In the genus *Tillandsia* the quantity of seeds per capsule is variable. In *T. stricta*, an average of 27 seeds per fruit were reported (Missagia and Alves, 2015), 115 in *T. achyrostachys*, 106 in *T. caput-medusae*, 92 in *T. circinnatioides*, 190 in *T. hubertiana*, and 99 in *T. schiedeana* (Flores-Palacios *et al.*, 2015). In *T. californii*

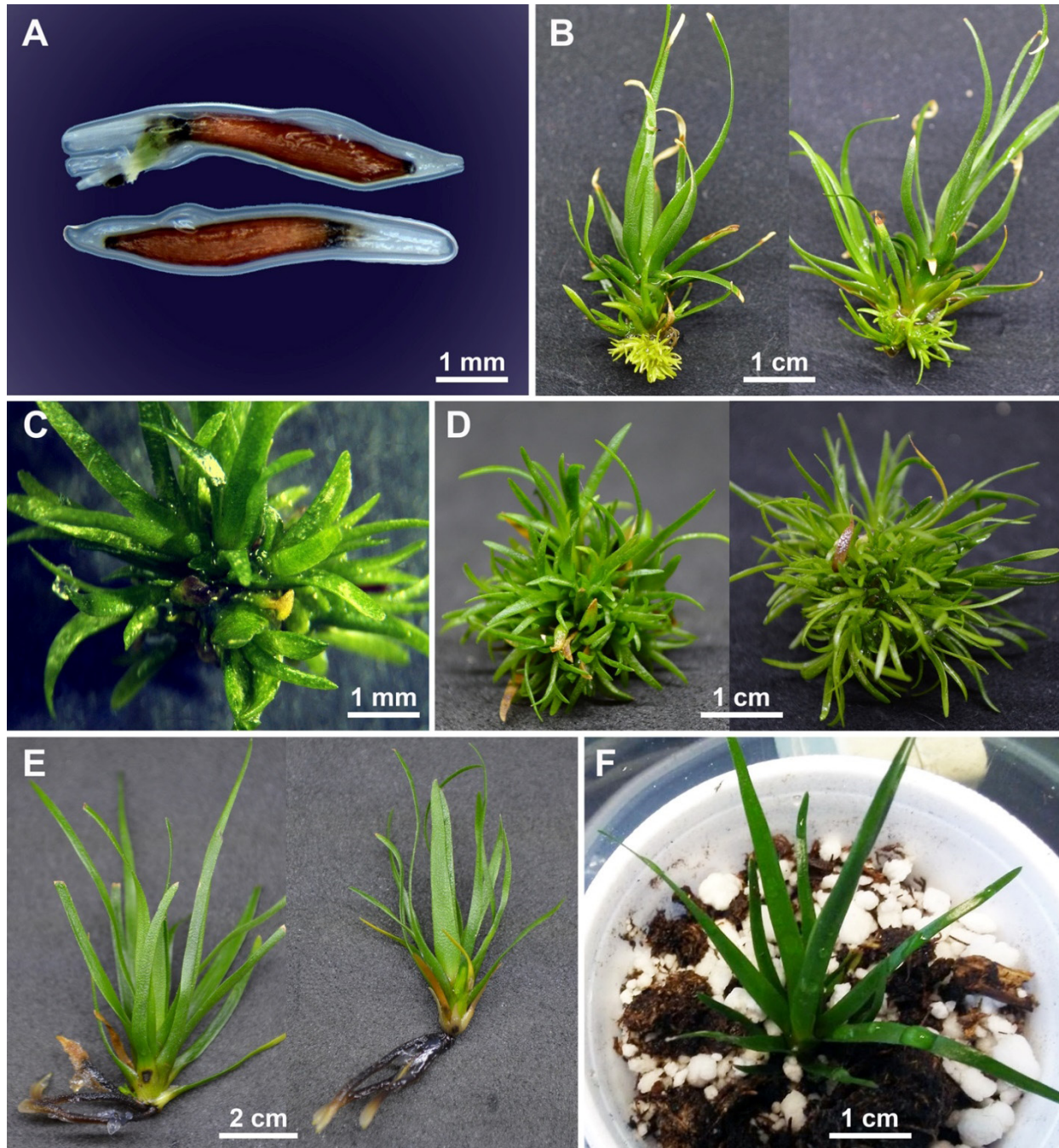


Figura 1. Regeneración *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* por organogénesis directa. A) Germinación *in vitro* después de dos semanas de cultivo; B) Brotes inducidos con $6.65 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de ANA a las 12 semanas; C) Multiplicación de brotes con $4.43 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de ANA después de 12 semanas de cultivo; D) Alargamiento de brotes con $5.7 \mu\text{M}$ de AG_3 después de seis semanas de cultivo; E) Enraizamiento *in vitro* con $1.0 \mu\text{M}$ de ANA después de seis semanas de cultivo; F) Aclimatación de plantas después de 11 semanas.

Figure 1. *In vitro* regeneration of *Tillandsia viridiflora* by direct organogenesis. A) *In vitro* germination after two weeks of culture; B) Shoots induced with $6.65 \mu\text{M}$ of BAP and $0.5 \mu\text{M}$ of NAA at 12 weeks; C) Shoot multiplication with $4.43 \mu\text{M}$ of BAP and $0.5 \mu\text{M}$ of NAA after 12 weeks of culture; D) Shoot elongation with $5.7 \mu\text{M}$ GA_3 after six weeks of culture; E) *In vitro* rooting with $1.0 \mu\text{M}$ NAA after six weeks of culture; F) Plant acclimatization after 11 weeks.

alcanzaron un tamaño promedio de 16.8 mm con 2.1 raíces después de 21 semanas del establecimiento *in vitro*. Esta respuesta demostró el crecimiento lento de las bromelias y en la literatura no hay documentación al respecto, por ello se evaluó en el presente estudio.

Las cápsulas de *T. viridiflora* contenían en promedio 500 semillas y el peso de 1000 semillas, sin el apéndice plumoso, fue de 400 mg. En el género *Tillandsia* la cantidad de semillas por cápsula es variable. En *T. stricta* se registraron en promedio 27 semillas por fruto (Missagia y Alves, 2015), 115 en *T. achyrostachys*, 106 en *T. caput-medusae*, 92 en *T. circinnatioides*, 190 en *T. hubertiana* y 99 en *T. schiedeana* (Flores-Palacios *et al.*, 2015). En *T. califanii* Rauh se encontró la cantidad mayor con 2000 semillas por fruto (García-Suárez *et al.*, 2006).

Respecto al medio de cultivo usado para la germinación *in vitro*, Calderón-Arias *et al.* (2011) mencionaron que las semillas de bromelias son sensibles a niveles altos de sales en el medio de cultivo en la etapa inicial. Pulido-Rueda *et al.* (2018) indicaron que el 50% de la concentración de sales del medio MS es favorable para la germinación en *V. incurvata*. La germinación de semillas de bromelias en su ambiente natural es variable y las condiciones ambientales la afectan. Para *Tillandsia monadelphica*, *T. bulbosa*, *T. anceps*, *T. subulifera* y *T. fasciculata* los porcentajes pueden fluctuar entre 97 y 100% (Correa y Zotz, 2014).

Regeneración de plantas por organogénesis directa

Inducción de brotes

La brotación se presentó en todos los tratamientos, incluido el medio sin reguladores de crecimiento; y fue del 100% con las concentraciones de 2.21, 3.32 y 4.43 μM de BAP combinadas con 0.5 μM de ANA después de 12 semanas de cultivo. La cantidad mayor de brotes por explante (10.4) se obtuvo con 6.65 μM de BAP y 0.5 μM de ANA a las 12 semanas (Figura 1B). En contraste, el medio sin reguladores de crecimiento solo produjo 0.3 brotes por explante (Cuadro 1).

Los brotes se observaron desde la segunda semana de cultivo en los tratamientos con reguladores de crecimiento, se formaron en la base de la plántula, presentaron coloración verde claro y morfología

Rauh, the highest quantity was reported with 2000 seeds per fruit (García-Suárez *et al.*, 2006).

Regarding the culture medium used for *in vitro* germination, Calderón-Arias *et al.* (2011) mentioned that bromeliad seeds are sensitive to high levels of salts in the culture medium in the initial stage. Pulido-Rueda *et al.* (2018) indicated that 50% of the salt concentration of the MS medium is favorable for germination in *V. incurvata*. The germination of bromeliad seeds in their natural environment is variable and environmental conditions affect them. For *Tillandsia monadelphica*, *T. bulbosa*, *T. anceps*, *T. subulifera* and *T. fasciculata*, percentages can fluctuate between 97 and 100% (Correa and Zotz, 2014).

Plant regeneration by direct organogenesis

Shoot induction

Shooting occurred in all treatments, including the medium without plant growth regulators; and it was 100% with the concentrations of 2.21, 3.32 and 4.43 μM of BAP combined with 0.5 μM of NAA after 12 weeks of culture. The highest number of shoots per explant (10.4) was obtained with 6.65 μM of BAP and 0.5 μM of NAA at 12 weeks (Figure 1B). In contrast, the medium without plant growth regulators only produced 0.3 shoots per explant (Table 1).

Shoots emerged at the second week of cultivation in the treatments with plant growth regulators; they were formed at the base of the seedling, and showed light green coloration and uniform morphology. After 12 weeks, shoots did not exceed 1 or 2 mm in length; and we used a stereoscopic microscope for the count.

Studies on *in vitro* propagation of bromeliads are scarce, but the species (as a factor) influence the organ-generation response. In *T. fasciculata* var. *fasciculata*, 75% shooting was induced with 0.5 μM of BAP and 0.5 μM of NAA (Koh and Davies, 2001). On the other hand, in *Tillandsia gardneri*, the highest shooting (91.67%) and the highest number of shoots per explant (1.92) were induced with 8.87 BAP μM (Pinto *et al.*, 2013). In the case of *Vriesea heliconioides*, 6.8 shoots per explant emerged by adding 10 μM of BAP and 1 μM of NAA (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). In *Orthophytum grossiorum*, 18.3% of the explants generated shoots with 10 BAP μM added to a stationary liquid medium (Manfio *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Respuestas organogénicas de *Tillandsia viridiflora* en la inducción de brotes a partir de plántulas *in vitro* con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las cuatro, ocho y doce semanas de cultivo.

Table 1. Organ-generation responses of *Tillandsia viridiflora* in the induction of shoots from seedlings *in vitro* with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) at four, eight and twelve weeks of culture.

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

Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$). B=Brotación, BE=Brotes por explante. ♦ Means with different letters in a column are significantly different ($p \leq 0.05$). B=Shooting, BE=shoots per explant.

uniforme. Después de 12 semanas los brotes no superaron 1 o 2 mm de longitud; y el conteo se hizo con un microscopio estereoscópico.

Los estudios sobre propagación *in vitro* de bromelias son escasos, pero se ha demostrado que el factor especie influye en las respuestas organogénicas. En *T. fasciculata* var. *fasciculata* se indujo 75% de brotación con 0.5 μ M de BAP y 0.5 μ M de ANA (Koh y Davies, 2001). En cambio, en *Tillandsia gardneri* la brotación mayor (91.67%) y cantidad mayor de brotes por explante (1.92) se indujo con 8.87 μ M de BAP (Pinto *et al.*, 2013). En el caso de *Vriesea heliconioides* se obtuvieron 6.8 brotes por explante con 10 μ M de BAP y 1 μ M de ANA (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). En *Orthophytum grossiorum* 18.3% de los explantes generó brotes con 10 μ M de BAP en medio líquido estacionario (Manfio *et al.*, 2010).

Multiplicación de brotes

La brotación fue 100% en las concentraciones de 4.4, 5.5 y 6.6 μ M de BAP combinadas con 0.5 μ M de ANA después de 12 semanas de cultivo. La cantidad mayor de brotes por explante (13.0) se obtuvo con 4.4 μ M de BAP y 0.5 μ M de ANA (Figura 1C). En contraste, el medio sin reguladores de crecimiento sólo produjo 0.4 brotes (Cuadro 2). El crecimiento fue similar a la fase de inducción y después de 12 semanas se observaron brotes de 1 o 2 mm de longitud.

Shoot multiplication

Shooting was 100% in concentrations of 4.4, 5.5 and 6.6 μ M BAP combined with 0.5 μ M NAA after 12 weeks of culture. The highest number of shoots per explant (13.0) occurred with 4.4 μ M of BAP and 0.5 μ M of NAA (Figure 1C). In contrast, the medium without plant growth regulators only produced 0.4 shoots (Table 2). Growth was similar to the induction phase and, after 12 weeks, shoots of 1 or 2 mm in length emerged.

In the micropropagation of some species of bromeliads, the induction phase is separated from the shoot multiplication phase (Guerra and Dal Vesco, 2010). However, these two stages are closely related. In *Nidularium procerum*, we obtained the best results for the multiplication of 14.9 shoots per explant with 4 μ M BAP; in contrast, for *N. innocentii* it was 2.8 shoots per explant with 8 μ M BAP (Da Silva *et al.*, 2012).

The results of *T. viridiflora* are similar to those documented in *Tillandsia gardneri*. The highest shooting percentage (91.6%) and the highest number of shoots per explant (1.9) were obtained with 8.87 μ M BAP (Pinto *et al.*, 2013). Other studies showed that the combination of BAP and NAA induces the *in vitro* morphogenesis of bromeliads. In *Aechmea blanchetiana*, 105.6 shoots were produced per explant and 223.8 in *Aechmea distichantha* with

Cuadro 2. Respuestas organogénicas de *Tillandsia viridiflora* en la multiplicación de brotes con 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) a las ocho y doce semanas de cultivo.

Table 2. Organ-generation response of *Tillandsia viridiflora* in shoot multiplication with 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA) at 8- and 12 weeks of culture.

BAP + ANA (μM)	8 semanas		12 semanas	
	B (%)	BE (Núm.)	B (%)	BE (Núm.)
0 + 0	20.0 b	0.3 e	20.0 b	0.4 c
2.21 + 0.5	80.0 a	2.2 cd	93.3 a	6.3 b
3.32 + 0.5	93.3 a	8.7 a	86.6 a	12.8 a
4.43 + 0.5	73.3 a	4.5 b	100.0 a	13.0 a
5.54 + 0.5	86.6 a	3.4 bc	100.0 a	5.7 b
6.65 + 0.5	73.3 a	1.8 de	100.0 a	6.9 b

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). B=Brotación; BE=Brotes por explante. ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$). B= Shooting, BE = Shoots per explant.

En la micropropagación de algunas especies de bromelias se separan la fase de inducción de la de multiplicación de brotes (Guerra y Dal Vesco, 2010). Sin embargo, estas dos etapas se relacionan de manera estrecha. En *Nidularium procerum* los resultados mejores para la multiplicación de 14.9 brotes por explante se obtuvieron con $4 \mu\text{M}$ de BAP; en cambio, para *N. innocentii* fue de 2.8 brotes por explante con $8 \mu\text{M}$ de BAP (Da Silva *et al.*, 2012).

Los resultados de *T. viridiflora* son similares con los documentados en *Tillandsia gardneri*. El porcentaje de brotación mayor (91.6%) y la cantidad mayor de brotes por explante (1.9) se obtuvieron con $8.87 \mu\text{M}$ de BAP (Pinto *et al.*, 2013). Otros estudios demostraron que la combinación de BAP y ANA inducen la morfogénesis *in vitro* de bromelias. En *Aechmea blanchetiana* se produjeron 105.6 brotes por explante y 223.8 en *Aechmea distichantha* con $2.2 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de ANA (Santa-Rosa *et al.*, 2013). En *Vriesea cacuminis* se obtuvieron 9.3 brotes por explante con $15 \mu\text{M}$ de BAP y $4.5 \mu\text{M}$ de ANA (Resende *et al.*, 2014). En *Vriesea heliconioides* $10 \mu\text{M}$ de BAP y $1 \mu\text{M}$ de ANA favorecieron la multiplicación de 7.4 brotes por explante (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

La capacidad de regeneración *in vitro* aumenta con la adición de BAP porque el compuesto estimula la división celular. El potencial de regeneración es

$2.2 \mu\text{M}$ de BAP y $0.5 \mu\text{M}$ de NAA (Santa-Rosa *et al.*, 2013). In *Vriesea cacuminis*, 9.3 shoots grew per explant with $15 \mu\text{M}$ of BAP and $4.5 \mu\text{M}$ of NAA (Resende *et al.*, 2014). In *Vriesea heliconioides*, $10 \mu\text{M}$ of BAP and $1 \mu\text{M}$ of NAA favored the multiplication of 7.4 shoots per explant (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

In vitro regeneration capacity increases with the addition of BAP because the compound stimulates cell division. The regeneration potential is greater as more cells are produced in a tissue (Anis and Ahmad, 2016). The variable number of shoots found per different species of bromeliads shows the influence of genotype and plant growth regulators on morphogenesis. BAP is the most widely used plant growth regulator in the *in vitro* regeneration of bromeliads; however, the use of N6 (2-isopentenyl) adenine (2-iP), as documented by other studies, is the cause of the proliferation of callus-like nodules in *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014). In the micropropagation of *Neoglaziovia variegata*, kinetin favored the best response (Silveira *et al.*, 2009).

Shoot elongation

The best response of shoot elongation (1.5 cm) resulted from $5.7 \mu\text{M}$ of GA_3 at eight weeks of culture (Figure 1D) (Table 3).

mayor conforme se producen más células en un tejido (Anis y Ahmad, 2016). La cantidad variable de brotes encontrada por especies diferentes de bromelias demuestra la influencia del genotipo y los reguladores de crecimiento en la morfogénesis. La BAP es el regulador más usado en la regeneración *in vitro* de bromelias; sin embargo, también se ha descrito que el uso de N6 (2-isopentenil) adenina (2-iP) causa la proliferación de nódulos semejantes a un callo en *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014). En la micropropagación de *Neoglaziovia variegata*, la cinetina favoreció la respuesta mejor (Silveira *et al.*, 2009).

Alargamiento de brotes

La respuesta mejor de alargamiento de brotes (1.5 cm) se obtuvo con 5.7 μM de AG_3 a las ocho semanas de cultivo (Figura 1D) (Cuadro 3).

En otras bromelias se ha reportado el crecimiento lento en condiciones *in vitro*, al igual que lo observado en *Tillandsia viridiflora*. Los brotes pueden requerir de 3 a 7 meses para alcanzar 1 cm de altura; como se ha reportado en *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.*, 2011), *Acanthostachys strobilacea* (Carvalho *et al.*, 2014), *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014) y *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). El crecimiento de las bromelias es lento en su hábitat natural y requieren años para alcanzar el estado adulto (Vázquez *et al.*, 2014). El crecimiento lento (1-2 mm en tres meses) también se observó en nuestro estudio bajo condiciones *in vitro* y por eso resultó importante usar el ácido giberélico (AG_3) para promover el crecimiento de brotes y plantas. El número de brotes se contabilizó a partir de los grupos de brotes ya inducidos, y solo se midió el alargamiento de los mismos.

El AG_3 participa en el desarrollo vegetal y en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se usa para promover el alargamiento celular de tallos y hojas (Anis y Ahmad, 2016). En *Vriesea reitzii* el alargamiento de los brotes fue óptimo con 10 μM de AG_3 y 2 μM de ácido indolacético (AIA) (Dal Vesco *et al.*, 2014). En *Vriesea heliconioides* 1 μM de AG_3 fue óptimo para lograr el alargamiento de brotes con promedio de 7.6 cm (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Enraizamiento de plantas

El porcentaje mayor de enraizamiento (95%) se obtuvo con 2.1 μM de AIB. El número mayor de

Cuadro 3. Alargamiento de brotes *in vitro* de *Tillandsia viridiflora* con ácido giberélico (AG_3) a las ocho semanas de cultivo.

Table 3. *In vitro* shoot elongation of *Tillandsia viridiflora* with gibberellic acid (GA_3) at eight weeks of culture.

AG_3 (μM)	Longitud del brote (cm)	Número de brotes (Núm.)
0	1.1 c	18.8 a
1.4	1.3 b	15.7 b
2.8	1.3 b	14.0 b
4.3	1.1 c	14.2 b
5.7	1.5 a	14.8 b

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

In other bromeliads, growth is slow under *in vitro* conditions, as seen in *Tillandsia viridiflora*. Shoots may require 3 to 7 months to reach 1 cm in height; as reported for *Alcantarea imperialis* (Mollo *et al.*, 2011), *Acanthostachys strobilacea* (Carvalho *et al.*, 2014), *Vriesea reitzii* (Dal Vesco *et al.*, 2014) and *Vriesea heliconioides* (Hernández-Meneses *et al.*, 2018). The growth of bromeliads is slow in their natural habitat and require years to reach adulthood (Vázquez *et al.*, 2014). We also observed slow growth (1-2 mm in three months) in our study under *in vitro* conditions, and therefore it was important to use gibberellic acid (GA_3) to promote shoot and plant growth. We counted the number of shoots from the groups of shoots already induced, and then only their elongation was measured.

The GA_3 participates in plant development, and is used *in vitro* plant tissue culture to promote cell elongation of stems and leaves (Anis and Ahmad, 2016). In *Vriesea reitzii*, shoot elongation was optimal with 10 μM of GA_3 and 2 μM of indoleacetic acid (IAA) (Dal Vesco *et al.*, 2014). In *Vriesea heliconioides*, 1 μM of GA_3 was optimal to achieve shoot elongation with an average of 7.6 cm (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Plant rooting

The highest percentage of rooting (95%) was obtained with 2.1 μM IBA; and we induced the highest number of roots with 1.0 μM NAA with 2.4 roots per plant (Figure 1E), although the highest root

raíces se indujo con 1.0 μM de ANA con 2.4 raíces por planta (Figura 1E), aunque la longitud mayor de raíz (1.5 cm) se obtuvo con 1.0 y 2.1 μM de AIB (Cuadro 4). El enraizamiento se observó desde la segunda semana de cultivo en todos los tratamientos. Las raíces fueron de color blanco claro y después de la tercera semana se tornaron de color café oscuro. El enraizamiento *in vitro* se induce al reducir las concentraciones de citocininas del medio de cultivo y aumentar las de auxinas (Anis y Ahmad, 2016). El ANA y el AIB son auxinas usadas para inducir el enraizamiento de plantas *in vitro* (Uribe *et al.*, 2012). En bromelias se ha encontrado que ambas auxinas favorecen el enraizamiento de plantas, aunque también se ha usado el AIA como inductor de brotes.

En *Nidularium innocentii* el enraizamiento fue 70% en medio líquido con 5.4 μM de ANA (Da silva *et al.*, 2012). En *N. concentrica* el enraizamiento se obtuvo con 3 μM de ANA a los 30 d y con 2, 3 y 4 μM de ANA, y 1 μM de AIB a los 60 d (Rodrigues *et al.*, 2013). En *V. cacuminis* 1.5 y 4.5 μM de ANA indujeron 1.9 raíces por planta después de 90 d de cultivo (Resende *et al.*, 2014). En la propagación *in vitro* de *Vriesea incurvata* se encontró que al reducir la cantidad de nitrógeno en 75% del medio de cultivo y adicionar 60 g L⁻¹ de sacarosa, las plantas formaron un número mayor de raíces con longitud promedio de 5.9 cm (Sasamori *et al.*, 2016). En contraste, en *Vriesea heliconioides* se utilizó el medio MS con la mitad de concentración de sales para inducir 4.6 raíces por planta (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

length (1.5 cm) was obtained with 1.0 and 2.1 μM IBA (Table 4). We observed rooting from the second week of cultivation in all treatments. The roots were light white and after the third week they turned dark brown. *In vitro* rooting is induced by reducing the cytokinin concentrations of the culture medium and increasing those of auxins (Anis and Ahmad, 2016). The NAA and IBA are auxins used to induce rooting of plants *in vitro* (Uribe *et al.*, 2012). In bromeliads, both auxins have proved to favor plant rooting, although IAA is also used as a shoot inducer.

Rooting of *Nidularium innocentii* was 70% in liquid medium with 5.4 μM of NAA (Da silva *et al.*, 2012). In *N. concentrica*, rooting was the result of 3 μM of NAA at 30 d, and with 2, 3 and 4 μM of NAA, and 1 μM of IBA at 60 d (Rodrigues *et al.*, 2013). In *V. cacuminis* 1.5 and 4.5 μM of NAA induced 1.9 roots per plant after 90 d of cultivation (Resende *et al.*, 2014). At the *in vitro* propagation of *Vriesea incurvata* we found that by a 75% reducing in the nitrogen amount of the culture medium and by adding 60 g L⁻¹ of sucrose, plant roots increased with an average length of 5.9 cm (Sasamori *et al.*, 2016). In contrast, in *Vriesea heliconioides* we utilized the MS medium with half the concentration of salts to induce 4.6 roots per plant (Hernández-Meneses *et al.*, 2018).

Plant acclimatization

The highest growth in height (6.9 cm) occurred in 6.5 cm plants with peat+perlite substrate (1:1), as

Cuadro 4. Enraizamiento *in vitro* de plantas de *Tillandsia viridiflora* con ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (AIB) a las seis semanas de cultivo.

Table 4. *In vitro* rooting of *Tillandsia viridiflora* plants with naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) at six weeks of culture.

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

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

Aclimatación de plantas

El crecimiento mayor en altura (6.9 cm) se obtuvo en plantas de 6.5 cm con sustrato de turba+perlita (1:1) al igual que la mayor longitud de raíz con 2.8 cm (Figura 1F). La supervivencia fue de 100% en todos los tratamientos evaluados y el número de hojas mayor se presentó en plantas de 6.5 cm con sustrato de corteza de pino después de 11 semanas (Cuadro 5).

Los porcentajes de supervivencia obtenidos en *T. viridiflora* son similares con los hallados en la aclimatación de *Aechmea blanchetiana* y *A. distichantha*, para las cuales se obtuvieron 90 y 97%, respectivamente, en una mezcla de corteza de pino, carbón, turba y vermiculita, después de 60 d (Santa-Rosa *et al.*, 2013). En *V. reitzii* la supervivencia fue 95% en cascarilla de arroz carbonizado, corteza de pino y mezcla de comercial Plantmax® (2:2:1 v/v) después de 15 semanas (Dal Vesco *et al.*, 2014). En *V. cacuminis* se obtuvo 90% de supervivencia con sustrato comercial Plantmax Hortalicas HT® (Eucatex Agro, SP) (Resende *et al.*, 2014). Respecto a la altura inicial de las plantas para la aclimatación, se ha referido que es un factor restrictivo, ya que 3 cm se considera el tamaño mínimo para que sea exitosa (Guerra y Dal Vesco, 2010). En nuestro estudio se observó que las dos alturas de planta evaluadas (4.5 y 6.5 cm) resultaron óptimas para la supervivencia.

CONCLUSIONES

La regeneración de plantas de *Tillandsia viridiflora* se obtuvo con éxito a partir de plántulas *in vitro* cultivadas en medio Murashige-Skoog, con

well as the longest root length with 2.8 cm (Figure 1F). Survival was 100% in all the evaluated treatments and the highest number of leaves appeared in 6.5 cm tall plants with pine bark substrate after 11 weeks (Table 5).

The survival percentages obtained in *T. viridiflora* are similar to those found in the acclimatization of *Aechmea blanchetiana* and *A. distichantha*, 90 and 97%, respectively, in a mixture of pine bark, coal, peat and vermiculite, after 60 d (Santa-Rosa *et al.*, 2013). In *V. reitzii*, survival was 95% in charred rice husk, pine bark and commercial Plantmax® mix (2:2:1 v/v) after 15 weeks (Dal Vesco *et al.*, 2014). In *V. cacuminis*, survival was 90% with the commercial substrate Plantmax Hortalicas HT® (Eucatex Agro, SP) (Resende *et al.*, 2014). The initial height of the plants for acclimatization is referred as a limiting factor, since 3 cm is considered the minimum size to be successful (Guerra and Dal Vesco, 2010). In our study, we observed that the two evaluated plant heights (4.5 and 6.5 cm) were optimal for survival.

CONCLUSIONS

The successful regeneration of *Tillandsia viridiflora* plants resulted from *in vitro* seedlings grown in Murashige-Skoog medium, with 6-benzylaminopurine and naphthaleneacetic acid. The elongation of the plants was possible by adding gibberellic acid.

The acclimatization procedure guarantees the survival of the plants in peat+perlite and pine bark substrates. This protocol offers an alternative for the mass production of *T. viridiflora* plants that can

Cuadro 5. Aclimatación de plantas de *Tillandsia viridiflora* obtenidas *in vitro* con sustrato de turba+perlita (T+P) y corteza de pino (CP) después de 12 semanas.

Table 5. Acclimatization of *Tillandsia viridiflora* plants obtained *in vitro* with peat+perlite (T+P) and pine bark (CP) substrates after 12 weeks.

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

Medias con letra diferente por columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$). ♦ Means with different letters per column indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético. El alargamiento se logró con la adición de ácido giberélico.

El procedimiento de aclimatación garantiza la supervivencia de las plantas en sustrato de turba+perlita y corteza de pino. Este protocolo ofrece una alternativa para la producción masiva de plantas de *T. viridiflora* que se pueden usar para la reintroducción, conservación y aprovechamiento comercial de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por las instalaciones facilitadas para el desarrollo de la investigación y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca nacional (No. 461795) otorgada para postgrado.

LITERATURA CITADA

Anis, M., and N. Ahmad. 2016. Plant tissue culture: a journey from research to commercialization. *In*: Anis, M., and N. Ahmad (eds). Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement. Springer, Singapore. pp: 3-13.

Calderón-Arias, A. M., A. Restrepo-Gómez, y A. I. Urrea-Trujillo. 2011. Morfogénesis *in vitro* a partir de yemas apicales y bases de hojas de las especies de bromelias *Aechmea veitchii* y *Racinaea crispa*. *Actual Biol.* 33: 17-33.

Carvalho, V., D. S. Santos, and C. C. Nievola. 2014. *In vitro* storage under slow growth and *ex vitro* acclimatization of the ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea*. *South African J. Bot.* 92: 39-43.

Correa, S., and G. Zots. 2014. The influence of collecting date, temperature and moisture regimes on the germination of epiphytic bromeliads. *Seed Sci. Res.* 24:353-363.

Da Silva, A. L. L., J. Da Luz A, G. Bomfim A, D. Crystina C, M. Ruzza S, L. A. Biasi, G. Newton S, and C. R. Soccol. 2012. Micropropagation of *Nidularium innocentii* lem. and *Nidularium procerum* lindm (bromeliaceae). *Pak. J. Bot.* 44: 1095-1101.

Dal Vesco, L. L., R. Pescador, J. P. Corredor P, L. J. Welter, and M. P. Guerra. 2014. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. *Acta Scientiarum Biol. Sci.* 36: 271-278.

Espejo-Serna, A., y A. R. López-Ferrari. 2018. La familia Bromeliaceae en México. *Bot. Sci.* 96: 533-554.

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 Hort.* 187: 72-79.

García-Suárez, M. D., V. Rico-Gray, N. Molina-Aceves, and H. Serrano. 2006. *In-vitro* germination and clonal propagation of endemic *Tillandsia califanii* Rauh (Bromeliaceae). *Selbyana* 27: 54-59.

Guerra, M. P., and L. L. Dal Vesco. 2010. Strategies for the micropropagation of bromeliads. *In*: Jain S. M., and S. J. Ochatt (eds). *Protocols for in vitro Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology* 589. Humana Press, New York. pp: 47-66.

be used for the reintroduction, conservation and commercial use of the species.

—End of the English version—



Hernández-Meneses, E., S. E. Rangel-Estrada, M. C. G. López-Peralta, A. Guerrero-Hilario, G. Ortiz-Gil, y L. Martínez-Bolaños. 2018. Germinación, viabilidad y regeneración *in vitro* de plantas de *Vriesea heliconioides* (Kunth) Hook. ex Walp. *Rev. Fitotec. Mex.* 41: 99-106.

Koh, Y. C., and F. T. Davies. 2001. Mutagénesis and *in vitro* culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. *fasciculata* (Bromeliaceae). *Scientia Hort.* 87: 225-240.

Lavor, P., C. van den Berg, C. M. Jacobi, F. F. Carmo, and L. M. Versieux. 2014. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. *Am. J. Bot.* 101: 1167-1175.

Manfio, C. E., S. Y. Motoike, C. C. de Paula, M. S. Valente, and C. G. Melo. 2010. Early selection of elite clones of an ornamental bromeliad *in vitro*. *Ciencia Rural* 40: 1537-1544.

Méndez, E. G., D. Mondragón, G. I. Cruz, y A. Vázquez. 2011. Usos de las bromelias en el estado de Oaxaca. Primera edición. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca, México. 55 p.

Missagia, C. C. C., and M. A. S. Alves. 2015. The rate of visitation by *Amazilia fimbriata* (Apodiformes: Trochilidae) influences seed production in *Tillandsia stricta* (Bromeliaceae). *Zoologia* 32: 260-262.

Mollo, L., M. C. M. Martins, V. F. Oliveira, C. C. Nievola, and R. de C. L. Figueiredo-Ribeiro. 2011. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 107: 141-149.

Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Pinto, A. C. R., M. E. S. P. Demattê, D. M. M. Santos, J. C. Barbosa, and S. A. Creste. 2013. Growth regulators for *in vitro* propagation of *Tillandsia gardneri* (Bromeliaceae). *Acta Hort.* 1002: 51-57.

Pulido-Rueda, E. E., M. A. Milaneze-Gutierrez, and R. Negrelle. 2018. *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae). *Acta Agron.* 67: 140-145.

Resende, C. F., C. Ribeiro, G. Camargo M, C. Q. Godoy S, V. Fernandes B, B. P Da Cruz, R. Camostrini F, and P. H. Pereira. 2014. *In vitro* culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia, Série Botânica, Porto Alegre* 71: 55-61.

Rodrigues, J. P. M., E. R. Schimildt, R. S. Alexander, B. R. Santos, and G. C. Magevski. 2013. Effect of synthetic auxins on *in vitro* and *ex vitro* bromeliad rooting. *Pesquisa Agropec. Trop.* 43: 138-146.

- Santa-Rosa, S., F. V. D. Souza, Á. M. Vidal, C. A. S. Ledo, and J. R. F. de Santana. 2013. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. *Hortic. Bras.* 31: 112-118.
- SAS, Institute 2003. The SAS system for windows. Release 9.1. SAS Institute Cary, NC, USA. 329 p.
- Sasamori, M. H., D. E. Junior, and A. Droste. 2016. Low macronutrient concentrations benefit *in vitro* propagation of *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), an endemic species of the Atlantic Forest, Brazil. *Rodriguésia* 67: 1071-1081.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre, 2010. http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf (Consulta: febrero 2017).
- Sheu, Y., A. S. Cunha-Machado, A. B. P. L. Gontijo, F. C. Favoreto, T. B. C. Soares, and F. D. Miranda. 2017. Genetic diversity of Bromeliaceae species from the Atlantic Forest. *Genetics Molecular Res.* 16: 1-8.
- Silveira, D. G., F. V. Duarte S, C. Regina P, A. da Silva S, C. A. da Silva L, and J. R. Ferreira. 2009. Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 923-932.
- Uribe, M. E., J. Ulloa, C. Delaveau, K. Sáez, F. Muñoz, y P. Cartes. 2012. Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento *in vitro* de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana Bot.* 69: 105-112.
- Vázquez, N. B., J. R. García N, M. Flores C, S. D. Koch O, y A. Robledo P. 2014. Germinación y viabilidad de *Tillandsia macdougallii* y *Tillandsia violacea* (Bromeliaceae) con fines de aprovechamiento sustentable. *Ciencia Tecnol. Agrop. México* 2: 30-35.
- Zotz, G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes - a critical update. *Bot. J. Linn Soc.* 171: 453-481.

