

**CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE
BILLBERGIA ROSEA (BROMELIACEAE)**

ADRIANA PARDO¹, CLARET MICHELANGELI² Y NORCA MOGOLLÓN¹

¹*Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado",
Decanato de Agronomía, Unidad de Biotecnología Vegetal (UCLA)
apardo@ucla.edu.ve, norcam@intercable.net.ve*

²*Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía (UCV),
Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA)
claremiche@gmail.com*

Resumen. Se estableció un protocolo para la conservación, en condiciones de crecimiento mínimo, en la especie *Billbergia rosea* hortus ex Beer, a partir de brotes en etapa de multiplicación. Se utilizaron 5 tratamientos: T1 = Agua destilada, T2 = ½ MS, T3 = ½ MS + 30 gL⁻¹ sacarosa, T4 = ¼ MS y T5 = ¼ MS + 30 gL⁻¹ sacarosa; todos con 9 gL⁻¹ de agar. Se aplicó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 40 repeticiones por tratamiento. Se empleó la prueba de Tukey para la comparación de medias y la vía no paramétrica (Kruskal-Wallis), por comparación de rangos múltiples. Las variables evaluadas, por un período de nueve meses, fueron: sobrevivencia, altura del brote (cm), número de hojas por brote y longitud de las raíces (cm), mientras que el vigor se evaluó al final del experimento. Los brotes de *B. rosea* cultivados en medio MS a ¼ de su concentración en presencia de sacarosa, crecieron lenta y gradualmente, manteniendo altos porcentajes de sobrevivencia y vigor, así como los mayores promedios para las variables evaluadas. De esta manera, el almacenamiento de *B. rosea* puede realizarse en este medio por un período de nueve meses sin necesidad de nuevos subcultivos, disminuyendo los costos, el empleo de mano de obra y los requerimientos de espacio en el laboratorio. El tratamiento con agua destilada estéril con agar, puede considerarse como un medio alternativo para la conservación *in vitro* de *B. rosea* por períodos de almacenamiento no superiores a los seis meses. *Recibido: 15 mayo 2007, Aceptado: 24 septiembre 2007.*

Palabras clave. *Billbergia rosea*, conservación *in vitro*, Bromeliaceae, crecimiento mínimo.

IN VITRO CONSERVATION OF *BILLBERGIA ROSEA* (BROMELIACEAE)

Abstract. A protocol was established to conserve *Billbergia rosea* hortus ex Beer under minimal growth conditions, using shoots in the multiplication stage. Five treatments were used as follows: T1 = distilled water, T2 = $\frac{1}{2}$ MS, T3 = $\frac{1}{2}$ MS + 30 gL⁻¹ sucrose, T4 = $\frac{1}{4}$ MS, and T5 = $\frac{1}{4}$ MS + 30 gL⁻¹ sucrose; all with 9 gL⁻¹ of agar. A random design was used with 5 treatments and 40 replications/treatment. We used the Tukey test to compare means, and the Kruskal-Wallis test for multiple range comparison. The variables: survival, shoot height (cm), number of leaves/shoot, and root length (cm) were measured for nine months, and vigor was determined at the end of the study. *Billbergia rosea* shoots cultured in MS media at $\frac{1}{4}$ concentration, in presence of sucrose, grew slowly and gradually, and maintained high survival and vigour percentages, as well as the highest means of all variables measured. Storage of *B. rosea* can be made at $\frac{1}{4}$ MS with sucrose during a nine month period without using new subcultures, resulting in lower costs, and less hand labor and laboratory space. The treatment with sterile distilled water with agar may be considered as an alternative medium to conserve *in vitro* *B. rosea* for storage periods not exceeding six months. *Received: 15 May 2007, accepted: 24 September 2007.*

Key words. *Billbergia rosea*, *in vitro* conservation, Bromeliaceae, minimal growth conditions.

INTRODUCCIÓN

Venezuela es un país privilegiado que posee una gran diversidad de bromeliáceas endémicas. Dentro de éstas, destaca como autóctona *Billbergia rosea* hortus ex Beer; conocida popularmente como flor de junio o parásita de San Juan (Esteva y Steyermark 1987). Esta especie es la más exuberante de su género ya que presenta inflorescencias colgantes de llamativos colores y extraordinaria belleza; además de ventajas comparativas frente a otras bromeliáceas, debido a su tolerancia a la sequía y a su baja exigencia en nutrientes (Esteva y Steyermark 1987). En la actualidad esta especie se encuentra en la categoría de vulnerable o amenazada de extinción, careciendo a diferencia de las orquídeas, de una regulación en el ámbito nacional e internacional que prohíba su comercio y distribución (Llamozas *et al.* 2003).

En bromeliáceas, sólo se ha reportado la conservación *in vitro* de la piña (*Ananas comosus*) (Zee y Munekata 1992), por lo que el reto actual está en desarrollar un método eficiente en *B. rosea* que facilite su colección, multiplicación, almacenamiento e intercambio internacional. Las técnicas de

cultivo de tejidos permiten la rápida propagación de materiales vegetales en ambientes controlados y asépticos, es decir, libres de plagas y enfermedades, obviándose las fluctuaciones de temperatura, cambios de clima, ataques de patógenos y otros problemas que constantemente afectan a las colecciones de campo (Hogkin *et al.* 2001). Asimismo, el tamaño de los explantes (2 cm promedio), disminuye los requerimientos de espacios, reduciendo con ello el costo de mantenimiento y el empleo de mano de obra (Engelmann 1997, 1998; Malaurie 2001).

Se han propuesto dos métodos básicos de conservación *in vitro*: el crecimiento mínimo y la criopreservación (George 1993). El crecimiento mínimo se basa en la regeneración vía organogénesis y tiene por finalidad reducir el metabolismo celular, manteniendo así el crecimiento de los materiales vegetales a tasas mínimas. De esta manera, se realizaría un solo subcultivo al año sin afectar con ello la viabilidad de los materiales (Engelmann 1998). Para ello, deben ser considerados diferentes factores, principalmente el estado fisiológico del explante, las temperaturas de almacenamiento, la concentración de minerales y azúcares, adición de agentes osmóticos, así como la presencia de reguladores del crecimiento, entre otros (Boxus 1998).

El método de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo, ha sido aplicado a una amplia variedad de especies vegetales, siendo hoy en día rutinariamente utilizado para la conservación de recursos genéticos de especies como yuca (*Manihot esculenta*), papa (*Solanum tuberosum*), taro (*Alocasia grandis*), cambures y plátanos (*Musa* sp.), batata (*Ipomoea batata*), ajo (*Allium sativum*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Engelmann 1997, 1998; Mandal 1997; Malaurie 2001).

A los fines de contribuir con la preservación y/o mantenimiento de la biodiversidad de *Billbergia rosea* Hortus Ex Beer, la presente investigación tiene como objetivo desarrollar un protocolo para su conservación *in vitro* bajo condiciones de crecimiento mínimo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal, del Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), en Tarabana, estado Lara, Venezuela.

Se utilizaron brotes en etapa de multiplicación con una altura de 3 a 4 cm y con 3 a 4 hojas/brote, provenientes del cultivo de ápices caulinares (Pardo 2007). El protocolo empleado para la conservación bajo crecimiento mínimo fue el utilizado en piña (*A. comosus*) por Zee y Munekata (1992). El medio Murashige y Skoog (MS) se preparó manteniendo la concentración total de los componentes: tiamina-HCl (30 mgL^{-1}), glicina (2 mgL^{-1}), ácido nicotínico (10 mgL^{-1}), piridoxina (1 mgL^{-1}) e inositol (100 mgL^{-1}). El pH se ajustó a $5,8 \pm 0,1$. Los tratamientos se conformaron de la siguiente manera: T_1 = Agua destilada, $T_2 = \frac{1}{2}$ MS, $T_3 = \frac{1}{2}$ MS con 30 gL^{-1} sacarosa, $T_4 = \frac{1}{4}$ MS y $T_5 = \frac{1}{4}$ MS con 30 gL^{-1} sacarosa; todos los tratamientos con 9 gL^{-1} de agar.

Los brotes se cultivaron en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 10 mL de medio y se mantuvieron durante nueve meses, sin subcultivos, en un ambiente controlado en cuarto de crecimiento con temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, iluminación de $13,5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 16 h.

Se aplicó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos, 40 repeticiones por tratamiento y un brote por tubo de ensayo como unidad experimental. Las variables evaluadas por un período de nueve meses, fueron: sobrevivencia, altura del brote (cm), número de hojas por brote y longitud de las raíces (cm). La sobrevivencia de los brotes se determinó como el total de plantas que permanecieron viables hasta el final del experimento, empleándose un arreglo factorial (5×3), correspondiente a 5 tratamientos y 3 fechas de evaluación (90, 180 y 270 días). Asimismo, se evaluó el vigor de los brotes a los 270 días, empleando una escala del 1 al 4. De acuerdo a ésta: 1 = Ausencia de color verde, 2 = Color verde en un 25%, 3 = Color verde en un 50% y 4 = Brotes totalmente verdes.

Los datos que cumplieron con los supuestos del análisis de la varianza, se procesaron mediante esta técnica, utilizándose la prueba de Tukey para la comparación de medias. En aquellos casos donde no se cumplieron dichos supuestos, se utilizó la vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) con la prueba de medias por comparación de rangos múltiples, indicándose sus respectivos promedios. En todos los casos, el nivel de significancia fue de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el cultivo de *B. rosea* en los cinco medios de conservación *in vitro*, los brotes en $\frac{1}{4}$ MS con de sacarosa mostraron 100% de sobrevivencia hasta los 90 días, manteniéndose la viabilidad en 86% al final del experimento (Tabla 1). Los brotes conservados en $\frac{1}{2}$ MS con sacarosa y en agua destilada,

Tabla 1. Supervivencia de los brotes en *Billbergia rosea*, cultivados en diferentes medios de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo.

Tratamiento	Supervivencia		
	90 días	180 días	270 días
1	96,0ab	93,3abc	74,0c
2	97,7ab	81,3abc	37,0d
3	98,0ab	95,3ab	78,7bc
4	95,3ab	82,0abc	41,3d
5	100,0a	99,3ab	86,3abc
CV (%) = 8,29			

1 = Agua destilada, 2 = ½ MS, 3 = ½ MS y 30 gL⁻¹ sacarosa, 4 = ¼ MS y 5 = ¼ MS y 30 gL⁻¹ sacarosa.

Valores con la misma letra, no difieren al nivel de $P \leq 0,05$, según la prueba de Tukey.

exhibieron 95 y 93% de supervivencia hasta los 180 días; mientras que a los 270 días la supervivencia de los mismos disminuyó en ambos tratamientos. Contrariamente, los brotes cultivados en ½ MS y ¼ MS, ambos sin sacarosa, presentaron los menores valores de supervivencia durante el transcurso del experimento, y perecieron en su mayoría a los 270 días (Tabla 1).

El vigor de los brotes cultivados en ¼ y ½ MS con sacarosa, registraron, según la escala establecida, un promedio de 3, seguidos por el tratamiento con agua destilada; mientras que los brotes conservados en ¼ y ½ MS sin sacarosa, presentaron los menores promedios con 2 y 1, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Vigor de los brotes de *Billbergia rosea*, cultivados en diferentes medios, a los 270 días de su conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo.

Tratamiento	Vigor
1	2,35b
2	1,00c
3	3,00a
4	2,00b
5	3,00a

Los valores de la mediana con la misma letra, no difieren al nivel de $P \leq 0,05$, según comparación múltiple no paramétrica.

En base a los resultados obtenidos se observó que la sobrevivencia y el vigor dependan en gran medida del tiempo de almacenamiento de los materiales bajo estas condiciones. Esto concuerda con lo señalado por Zee y Munekata (1992), quienes observaron que independientemente de los tratamientos de conservación utilizados, todos los brotes de piña (*A. comosus*) se tornaron marrones y se secaron después de transcurridos los diez meses de almacenamiento, afectando con ello el vigor y la sobrevivencia de los genotipos.

Lisek y Orlikowska (2001) trabajando con fresa (*Fragaria* sp.) y Reed (1999) con menta (*Mentha* sp.), encontraron que los brotes conservados bajo condiciones de crecimiento mínimo, permanecieron vigorosos hasta los seis y nueve meses, respectivamente, tornándose posteriormente necróticos, sugiriendo la importancia del tiempo de almacenamiento de los materiales independientemente de los medios de cultivo utilizados. Por consiguiente, la respuesta observada en *B. rosea*, a los nueve meses de almacenamiento, siguió la misma tendencia que la reportada en piña, fresa y menta.

Los análisis de las variables altura de brotes (cm), número de hojas/brotes y longitud de las raíces, en *B. rosea*, revelaron diferencias significativas entre los tratamientos a partir de los tres meses de iniciado el experimento. Para la variable altura de brotes, la prueba de Tukey conformó tres grupos a los 270 días. En el primero se ubicaron los brotes cultivados en $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa (Tratamiento 5), con un incremento de 2,96 cm de altura desde los 30 hasta los 270 días (Tabla 3). En un segundo grupo, los brotes cultivados en $\frac{1}{2}$ MS con sacarosa y en agua destilada, mostraron esta misma tendencia, ya que se observaron incrementos en altura desde los 30 hasta los 270 días en cultivo. En un tercer grupo, los brotes conservados en $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{4}$ MS en ausencia de sacarosa, incrementaron su altura hasta los 210 días, fecha a partir de la cual dichos promedios disminuyeron. Estos resultados sugieren que en ausencia de sacarosa, la mayoría de los brotes se deterioraron drásticamente entre los 240 a 270 días, lo cual afectó el vigor y la sobrevivencia de los mismos.

Para la variable número de hojas/brotes, la prueba de Tukey detectó diferencias significativas entre los tratamientos, conformando tres grupos a los 270 días de evaluación (Tabla 4). En un primer grupo, los brotes cultivados en $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa (Tratamiento 5), incrementaron el número de sus hojas desde los 30 (7,3) hasta los 270 días (13,9); mientras que los brotes conservados en $\frac{1}{2}$ MS con sacarosa (Tratamiento 3) incrementaron el número de sus hojas hasta los 210 días (14,5). Seguidamente, los tratamientos con agua destilada y $\frac{1}{2}$ MS sin sacarosa aumentaron el número de hojas hasta los

Tabla 3. Altura de los brotes (cm) en *Billbergia rosea*, cultivados en diferentes medios de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo.

Trat.	Días									
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
1	517a	5,92 ^a	6,23b	6,30b	6,65b	6,59b	6,61b	6,76bc	7,43ab	
2	5,43a	5,52 ^a	5,96b	6,11b	6,49b	6,76b	6,78b	6,52c	6,76b	
3	5,57a	5,93 ^a	6,68ab	6,87ab	7,20ab	7,53ab	7,72ab	7,88ab	7,96ab	
4	5,61a	6,15 ^a	6,16b	6,37b	6,61b	6,73b	6,76b	6,58c	6,64b	
5	5,68a	6,12a	7,23a	7,47a	8,39a	8,42a	8,58a	8,62a	8,64a	
CV(%)	24,8	28,2	28,9	31,5	31,6	31,8	33,1	34,8	36,5	

1 = Agua destilada, 2 = ½ MS, 3 = ½ MS y 30 gL⁻¹ sacarosa, 4 = ¼ MS, 5 = ¼ MS y 30 gL⁻¹ sacarosa, Trat. = Tratamiento.

Valores con la misma letra, dentro de las columnas, no difieren al nivel de $P \leq 0.05$, según la prueba de Tukey.

210 días. En un tercer grupo, los brotes cultivados en $\frac{1}{4}$ MS alcanzaron un promedio de 7,9 hojas /brotes, al final del experimento.

Los resultados indicaron que los tratamientos con $\frac{1}{4}$ MS y $\frac{1}{2}$ MS en presencia de sacarosa presentaron los mayores promedios en altura y número de hojas. Debido a que las plantas en condiciones *in vitro* no son completamente autotróficas (George 1993), probablemente el suministro de este carbohidrato como fuente de energía permitió que los brotes cultivados en estos medios, procesaran las sales y otras sustancias contenidas en los mismos para realizar las actividades implicadas en el metabolismo del carbono y su conversión en nuevos tejidos o biomasa, tal como lo plantea Foyer (1988).

En relación a la rizogénesis, la cual ocurrió en todos los tratamientos a partir de los 90 días, la comparación de los rangos múltiples detectó diferencias significativas entre los cinco medios de conservación (Tabla 5).

Las raíces de los brotes cultivados en el medio $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa, incrementaron la longitud de sus raíces hasta los 180 días (5,16 cm). Sin embargo, esta variable experimentó una disminución entre los 210 y 240 días, para luego incrementar 4,19 cm de longitud a los 270 días. Similarmente, los brotes cultivados en $\frac{1}{2}$ MS con sacarosa y en agua destilada, registraron aumentos en la longitud de sus raíces hasta los 210 y 180 días, para posteriormente disminuir al final del experimento. El comportamiento observado en ambos tratamientos puede estar relacionado con el necrosamiento de los extremos de las raíces y posterior muerte, que experimentaron el 18 y 12% de los brotes en ambos tratamientos.

En los tratamientos con $\frac{1}{4}$ MS y $\frac{1}{2}$ MS las raíces crecieron hasta los 150 días. Posteriormente, las raíces se tornaron necróticas y a partir de los 210 días, el 44 y 39% de los brotes cultivados perecieron en ausencia de sacarosa, lo cual explicó los menores promedios observados a los 270 días del experimento (0,93 y 1,00 respectivamente).

El comportamiento observado en las raíces probablemente se asocia a que en *B. rosea*, especie epífita-CAM, la absorción de nutrimentos se realiza por las hojas, mientras que las raíces funcionan, exclusivamente, como estructuras de soporte de la planta (Luttge 2002, 2004). De esta manera, con pocos nutrimentos y sales en el medio de cultivo, el mecanismo fisiológico de los brotes se dirigió más hacia la producción de hojas que de raíces. Por ello, el sistema radical en todos los tratamientos de conservación utilizados, se desarrolló escasamente.

Tabla 4. Número de hojas/brotes en *Billbergia rosea*, cultivados en diferentes medios de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo.

Trat.	Días									
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	
1	6,2b	8,1a	8,2ab	8,5bc	9,0bc	9,1bc	9,3bc	9,2ab	9,2bc	
2	6,8ab	7,7a	7,9ab	8,4bc	9,6bc	9,1bc	8,8bc	8,0b	8,5bc	
3	6,9ab	8,4a	9,6a	10,9a	11,3ab	12,3ab	14,5a	13,2a	12,9a	
4	6,2b	7,1a	7,5b	7,8c	8,7c	8,8c	8,2c	7,1c	7,9c	
5	7,3a	7,9a	9,1ab	10,8ab	12,9a	12,6a	13,2ab	13,8a	13,9a	
CV(%)	18,5	24,3	25,8	27,8	29,8	32,8	33,1	35,5	38,1	

1 = Agua destilada, 2 = ½ MS, 3 = ½ MS y 30 gL⁻¹ sacarosa, 4 = ¼ MS, 5 = ¼ MS y 30 gL⁻¹ sacarosa, Trat. = Tratamiento.

Valores con la misma letra, dentro de las columnas, no difieren al nivel de $P \leq 0,05$, según la prueba de Tukey.

Tabla 5. Longitud de las raíces (cm) en brotes de *Billbergia rosea*, cultivados en diferentes medios de conservación, bajo condiciones de crecimiento mínimo.

T	Rango y promedio de la longitud de raíces (cm)							
	90 días		120 días		150 días		180 días	
1	122,9ab	1,64	105,9bc	1,72	125,8b	2,81	143,1ab	3,31
2	102,4b	0,86	86,0c	1,14	105,5bc	1,77	109,0b	1,64
3	129,8 ^a	2,73	143,6ab	2,89	130,3b	3,04	138,3ab	3,15
4	113,2b	1,31	94,7c	1,39	123,6b	2,50	102,1b	1,59
5	132,6a	3,12	150,5a	3,44	194,6a	5,16	173,3a	5,16

T	210 días		240 días		270 días	
1	114,7ab	3,07	82,2ab	2,17	103,3bc	1,75
2	94,3b	1,47	71,5b	1,39	96,4c	1,00
3	151,9 ^a	3,43	119,9 ^a	3,13	142,6ab	3,17
4	91,7b	1,45	61,7b	1,00	96,4c	0,93
5	152,3a	3,50	126,8a	3,90	149,2a	4,19

T = Tratamiento, 1 = Agua destilada, 2 = ½ MS, 3 = ½ MS y 30 gL⁻¹ de sacarosa, 4 = ¼ MS, 5 = ¼ MS y 30 gL⁻¹ de sacarosa. Valores con la misma letra, dentro de las columnas, no difieren al nivel de $P \leq 0,05$, según comparación múltiple no paramétrica.

Los resultados obtenidos durante la conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo, revelaron que los brotes cultivados en el medio ¼ MS con 30 gL⁻¹ de sacarosa, presentaron los mayores promedios de altura, número de hojas/brotes y longitud de raíces, seguido por los cultivados en ½ MS y 30 gL⁻¹ de sacarosa. Esto reafirma la importancia de este carbohidrato en los medios de cultivo para mantener el balance carbohidratos-sales necesario en los tejidos (George 1993). Esto fue confirmado por Valladares *et al.* (2002) al mencionar que la incorporación de la sacarosa es necesaria para activar el mecanismo fisiológico y mantener una relación carbohidratos-sales adecuada en las plantas. Posiblemente, esto permitió una eficiente traslocación del agua y nutrientes desde las hojas hasta los diferentes órganos, a pesar del lento crecimiento observado en las plantas.

Contrariamente, en ausencia de sacarosa los brotes no lograron evitar la pérdida de agua y turgencia celular, causándose por ende la deshidratación en los tejidos (Foyer 1988). Esto explica los menores valores de sobrevivencia y vigor, así como para las otras variables evaluadas. Similares resultados fueron obtenidos por Zee y Munekata (1992), quienes al evaluar diferentes entradas

de *A. comosus*, encontraron que bajo condiciones de crecimiento mínimo, las plantas cultivadas en $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ MS con 30 gL^{-1} de sacarosa, experimentaron un mayor crecimiento en biomasa en comparación con los brotes cultivados en medios de cultivo sin sacarosa.

En cuanto a la concentración del medio MS, los mejores resultados se obtuvieron cuando se usó a $\frac{1}{4}$ de su concentración, lo cual sugiere la existencia de cierta susceptibilidad a la salinidad de *B. rosea* bajo condiciones *in vitro*. La mayoría de las evidencias indican que las plantas epífitas-CAM son altamente sensibles a la salinidad, ya que al absorber agua y nutrimentos por las hojas, no están forzadas a desarrollar un mecanismo de tolerancia a la presencia de sales (Moradshahi *et al.* 1977, Luttge 2004).

El tratamiento con agua destilada estéril, igualmente se puede considerar como un medio adecuado para la conservación *in vitro* de *B. rosea*, ya que los brotes presentaron incrementos en biomasa superiores a aquellos conservados en ausencia de sacarosa. Esta respuesta se debió a que estos brotes no se sometieron a condiciones de estrés salino, logrando mantener el balance osmótico en ausencia de sales y azúcar en el medio, por lo cual no se deterioraron tan rápidamente como aquellos cultivados en medio MS sin sacarosa. Se han observado resultados similares en piña (Zee y Munekata, 1992), ya que el tratamiento con agua destilada estéril resultó igualmente un medio aceptable para el mantenimiento de los brotes de diferentes entradas de esta especie.

El protocolo establecido constituye un aporte a la preservación y/o mantenimiento de la biodiversidad de esta especie, lo cual resulta de gran valor considerando que ha sido ubicada en la categoría de vulnerable o amenazada, de acuerdo al libro Rojo de la Flora Venezolana (Llamozas *et al.* 2003).

CONCLUSIONES

El almacenamiento de *B. rosea* puede realizarse en $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa por un período de nueve meses sin necesidad de realizar nuevos subcultivos, garantizando que este germoplasma se encuentre disponible de manera inmediata para la ejecución de programas de mejoramiento genético. El empleo del agua destilada estéril con 9 gL^{-1} de agar, constituye un medio alternativo para la conservación de brotes de *B. rosea* por períodos no superiores a los seis meses, obteniéndose un beneficio económico, por los bajos costos en su preparación.

AGRADECIMIENTOS

A mi hijo Paúl Azuaje por ser inspiración eterna de mi vida. Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) y Fondo PPI por el financiamiento otorgado. Al personal de la Unidad de Biotecnología de la Universidad Centro Occidental “Lisando Alvarado” (UCLA).

LITERATURA CITADA

- BOXUS, P. 1998. Plant biotechnology applied to horticultural crops. *Acta Hort.* 495: 293–304.
- ENGELMANN, F. 1997. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources. *Acta Hort.* 447: 471–475.
- ENGELMANN, F. 1998. *In vitro* conservation of horticultural genetic resources review of the state of the art. *Acta Hort.* 495: 245–249.
- ESTEVA, F Y J. STEYERMARK. 1987. Las Bromeliaceae de Venezuela (1 ed.). Ediciones Armitano, Caracas, Venezuela, 398 pp.
- FOYER, C. 1988. Feedback inhibition of photosynthesis through source-sink regulation in leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 483–492.
- GEORGE, E. 1993. Plant propagation by tissue culture, Parte 1: The technology (2 ed.). Exegetics Limited, Edington Wilts, England, 574 pp.
- HODGKIN, T, R. ROVIGLIONI, M. DE VICENTE Y N. DUDNIK. 2001. Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Hort.* 546: 107–118.
- LISEK, A Y T. ORLIKOWSKA. 2001. Factors influencing long-term storage of strawberry shoots *in vitro*. *Acta Hort.* 560: 189–191.
- LLAMOZAS, S, R. DUNO, W. MEIER, R. RIINA, R. STAULFER, G. AYMARD, C. HUBER Y R. ORTIZ. 2003. Libro rojo de la flora venezolana (1 ed.). Editorial Provita, Fundación Polar, Caracas, Venezuela, 557 pp.
- LUTTGE, U. 2002. CO₂ concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. *J. Experimental Botany* 53(378): 2131–2142.
- LUTTGE, U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629–652.
- MALAUURIE, B. 2001. Medium and long term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. *Acta Hort.* 560: 69–77.
- MANDAL, B. 1997. Application of *in vitro* cryopreservation techniques in conservation of horticultural crop germplasm. *Acta Hort.* 447: 483–489.
- MORADSHAHI, A, K. VINES Y C. BLACK. 1977. CO₂ exchange and acidity levels in detached pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr., leaves during the day at various temperatures, O₂ and CO₂ concentrations. *Plant Physiol.* 59: 274–278.
- PARDO, A. 2007. Cultivo de tejidos e inducción de mutaciones en *Billbergia rosea* Hortus Ex Beer (Bromeliaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Estado Aragua, Venezuela, 241 pp.

- REED, B. 1999. *In vitro* storage conditions for mint germplasm. HortScience 34(2): 350–352.
- VALLADARES, F, J. SKILLMAN Y R. PEARCY. 2002. Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understory plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation. American J. Botany 89(8): 1275–1284.
- ZEE, F Y M. MUNEKATA. 1992. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. HortScience 27(1): 57–58.

