

**Frecuencia de inmersión y volumen de medio de cultivo para la formación de microcormos de gladiolo en Biorreactores de Inmersión Temporal**

Immersion frequency and volume of culture medium for the formation of gladiolus microcorms in Temporary Immersion Bioreactors

Formación de microcormos de gladiolo en Biorreactores

José Antonio Chávez-García<sup>1</sup>, María Claudia Rueda-Barrientos<sup>1\*</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1</sup>, Porfirio Juárez López<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, 62209, Morelos, México.

\*Autor para correspondencia: [claudia.rueda@uaem.mx](mailto:claudia.rueda@uaem.mx)

José Antonio Chávez-García, <https://orcid.org/0000-0002-1480-8401>

María Claudia Rueda-Barrientos, <https://orcid.org/0000-0001-5460-7754>

María Andrade-Rodríguez, <https://orcid.org/0000-0003-0757-742X>

Porfirio Juárez López, <https://orcid.org/0000-0002-4241-1110>

Fecha de recepción: 23 de noviembre de 2023

Fecha de aceptación: 1 de marzo de 2024

**RESUMEN**

Con el propósito de desarrollar un protocolo para la reproducción masiva de microcormos de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort. cv Amsterdam) en Biorreactor de Inmersión Temporal. Se determinó el efecto de diferentes frecuencias de inmersión (4, 8 y 12 h) y seis variantes del volumen de medio de cultivo (27.7, 33.3, 41.6, 55.5, 83.3, 166.6 mL, por explante). En cada caso se uso un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Después de 110 días de incubación; se contó el número de brotes por propágulo, longitud de brote, número de raíces, longitud de raíz, número, diámetro y peso de microcormos. Los resultados mostraron que con la frecuencia de inmersión cada 4 horas y con 55.6 mL de medio cultivo por explante, se obtuvieron 34.8 microcormos por explante como mejor resultado.

**PALABRAS CLAVE**

Sistema de Inmersión Temporal, Micropropagación masiva

**ABSTRACT**

With the purpose of developing a protocol for the massive reproduction of microcorms of gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort. cv Amsterdam) in a Temporary Immersion Bioreactor. The effect of different immersion frequencies (4, 8 and 12 h) and six variants of

the volume of culture medium (27.7, 33.3, 41.6, 55.5, 83.3, 166.6 mL, per explant) was determined. In each case, a completely randomized experimental design was used with four repetitions per treatment. After 110 days of incubation; the number of shoots per propagule, shoot length, number of roots, root length, number, diameter and weight of microcorms was counted. The results showed that with the immersion frequency every 4 hours and with 55.6 mL of culture medium per explant, 34.8 microcorms per explant were obtained as the best result.

## **KEYWORDS**

Temporary Immersion System, Massive Micropropagation

## **INTRODUCCIÓN**

En la industria de producción de flores, la propagación clonal a través del cultivo de tejidos, es una metodología que tiene un gran potencial de uso, debido a los actuales niveles altos de trabajo manual y grado de automatización bajo, por lo que a la fecha no se ha utilizado eficientemente (Ruffoni y Savona 2005). En la actualidad, el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) ha permitido elevar las tasas de multiplicación de manera significativa. Esta tecnología tiene el potencial de producir grandes cantidades de plantas de manera económica y eficiente, lo que facilita la automatización de los sistemas de cultivo (Aguirre et al. 2016; Businge et al. 2017; Mendonça et al. 2016). Su mecanismo se basa en someter el explante a ciclos alternos de inmersión temporal (pocos minutos) en el medio líquido, seguido del drenaje y la exposición del tejido a un medio ambiente gaseoso renovado. Algunas de las variables a controlar en este tipo de biorreactores son la duración y frecuencia de la inmersión, así como el volumen del medio de cultivo (Albany et al. 2015; Albarrán et al. 2004; Alvarenga y Salazar 2015).

El ambiente en el interior de los recipientes de cultivo presenta variaciones de temperatura, humedad relativa elevada y grandes cambios diarios en la concentración de CO<sub>2</sub>, mismas que pueden ser afectadas por el tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre); aspectos que pueden condicionar la evolución de la composición gaseosa durante el período de cultivo (Cañal et al. 2001; Othmani et al. 2017).

En los SIT intervienen una serie de factores físicos, mecánicos y ambientales que una vez definidos posibilitan obtener una mejor respuesta fisiológica y una mayor eficiencia en el cultivo. Los explantes están en contacto intermitente con el medio de cultivo y esto causa una estimulación en la toma de nutrientes, por lo que el tiempo y la frecuencia de inmersión del cultivo permite controlar la cantidad de nutrientes, evita las pérdidas debido al consumo de los explantes y la evapotranspiración y se logra la renovación de la atmósfera dentro del recipiente a intervalos regulares; lo anterior aumenta el suministro de oxígeno y elimina la acumulación de gases nocivos en el recipiente de cultivo (De Feria et al. 2013; Escalona et al. 2007; Etienne y Berthouly 2002). El volumen de medio adecuado aumenta la productividad y calidad del material propagado. Se ha demostrado que el ajuste de estos factores mejora el desarrollo y crecimiento de los brotes, además de la morfología y fisiología con respecto a las plantas obtenidas en los sistemas en medio de cultivo líquido (Lian et al. 2014; Oviedo-Pereira et al. 2015).

La técnica de propagación masiva haciendo uso de biorreactores de inmersión temporal representa una alternativa eficiente para la producción de microcormos de gladiolo, por lo que es necesario definir aspectos que pueden contribuir a mejorar la cantidad y calidad de los microcormos. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el

efecto de tres frecuencias de inmersión y seis variantes del volumen de medio de cultivo por explante en gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) cv Amsterdam.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se realizó en el laboratorio de micropropagación del Centro de Desarrollo Tecnológico del Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura (FIRA), en Tezoyuca, Morelos, México. Los explantes usados en la investigación fueron tomados de cormos de gladiolo, variedad 'Ámsterdam'.

### **Sistema de Inmersión Temporal (BIT)**

El BIT estuvo compuesto por dos frascos de vidrio tipo conserveros de 890 mL de capacidad, uno para el crecimiento de los brotes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Los frascos se conectaron entre sí con una manguera de silicona autoclaveable mediante conectores (pasa muros) colocados en la tapa de los frascos. En la parte interna de los frascos se colocó una manguera, la cual descendió hasta el fondo en ambos recipientes. La circulación del medio de cultivo de un frasco a otro se realizó a través de dos electroválvulas de tres vías, las cuales estuvieron conectadas a un temporizador programable para determinar el tiempo y frecuencia de la inmersión. En la entrada de los frascos de cultivo se colocaron filtros hidrofóbicos (0.22  $\mu\text{m}$ , MIDISART® 2000, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co., Gotemburgo, Alemania), para garantizar la esterilidad del aire. El aire a presión se inyectó con un compresor regulado por un manómetro.

### **Material vegetal**

Para la evaluación de tiempo de inmersión y volumen de medio de cultivo, se establecieron *in vitro* y se cultivaron en medio Murashige y Skoog (1962). Los explantes se mantuvieron en cultivo durante dos periodos de 30 días, haciendo un subcultivo al mismo medio. Después de este tiempo, los propágulos (brotes en racimo menores a 10 mm de altura) estuvieron en condiciones de ser usados para los que se describen a continuación.

### **Evaluación de la frecuencia de inmersión**

El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (1962) suplementado con tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico (1 mg L<sup>-1</sup>), 120 mg L<sup>-1</sup> de Inositol, 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido 3-indolbutírico (AIB), 0.6 mg L<sup>-1</sup> de 2- isopentiladenina (2 Ip) y 8 % de sacarosa; el pH se ajustó a 5.7. Se dosificaron alícuotas de 250 mL de medio de cultivo en frascos de vidrio de 890 mL y junto con los biorreactores tipo BIT, previamente armados, se esterilizaron en autoclave a 1.2 kg cm<sup>-2</sup>, 120 °C, durante 18 min.

La siembra en los frascos BIT se realizó en condiciones asépticas en campana de flujo laminar y consistió en colocar 5 explantes por frasco, previamente cultivados *in vitro* en medio semisólido (brotes en racimo menores a 10 mm de altura), posteriormente se colocó el medio de cultivo esterilizado en el frasco reservorio de medio (250 mL).

Los recipientes de cultivo fueron incubados durante 110 días a 24  $\pm$  2 °C, un fotoperiodo de 16 h luz (1,800 lux) y ocho horas de oscuridad.

### **Diseño experimental**

Se evaluaron tres frecuencias de inmersión, cada 4, 8 y 12 h, con 3 min por inmersión. Se usó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento.

La unidad experimental constó de un sistema BIT (un frasco para el crecimiento de los brotes y otro como reservorio de medio de cultivo).

#### **Variables evaluadas**

Después de 110 días de incubación, se contó el número de brotes por propágulo o explante, número de raíces y se midió la longitud de brote y, longitud de raíz; además, se registró el número, diámetro y peso de microcormos. Las variables de longitud y diámetro se midieron con vernier digital Caldi-6MP® (Truper®, Ciudad de México, México).

#### **Evaluación del volumen de medio de cultivo**

El material vegetal (explantes) utilizado para la realización de este experimento se obtuvo de la misma manera que el experimento anterior. El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (Murashige y Skoog 1962) suplementado con tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $120 \text{ mg L}^{-1}$  de Inositol,  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido 3-indolbutírico (AIB),  $0.6 \text{ mgL}^{-1}$  de 2- isopentiladenina (2Ip) y 8 % de sacarosa; el pH se ajustó a 5.7. Por cada sistema BIT se colocaron 500 mL de medio de cultivo y se esterilizó en autoclave a  $1.2 \text{ kg cm}^{-2}$ ,  $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 18 min.

Los explantes se cultivaron en inmersión temporal utilizando el BIT; se colocaron 18, 15, 12, 9, 6, 3 explantes por frasco de cultivo, lo que dio lugar a utilizar 27.7, 33.3, 41.6, 55.5, 83.3, y 166.6 mL de medio de cultivo por explante, respectivamente. Se usaron 3 min de inmersión con frecuencia de 4 horas.

Los recipientes de cultivo se mantuvieron en incubación durante 110 días a una temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 h luz (1,800 lux) y ocho horas de oscuridad, con el uso de lámparas de luz blanca.

#### **Diseño experimental**

Se estudiaron seis tratamientos, 27.7, 33.3, 41.6, 55.5, 83.3, 166.6 mL de medio de cultivo por explante en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Cada unidad experimental estuvo integrada por un sistema BIT como se describió anteriormente.

#### **Variables evaluadas**

Después de 110 días de cultivo, se contó el número de brotes por explante y número de raíces, se midió la longitud de brote y de raíz, también se evaluó el número, diámetro y peso de microcormos. Las variables de longitud y diámetro se midieron con vernier digital Caldi-6MP® (Truper®, Ciudad de México, México).

#### **Análisis de datos**

Para ambos experimentos, los datos obtenidos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); con el uso del software SAS 9.0 (SAS Institute 2002).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **Evaluación de la frecuencia de inmersión**

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) por efecto de la frecuencia de inmersión para número de brotes formados por explante, longitud de brotes y número de microcormos, en tanto que el efecto fue significativo ( $p \leq 0.05$ ) para el número de raíces. Por el contrario, la longitud de raíz, diámetro y peso de microcormo, no fueron afectados por la frecuencia de inmersión (Cuadro 1). Al respecto, Rosales et al. (2018),

mencionan que el tiempo y frecuencia de inmersión son dos factores fundamentales para lograr mayor tasa de multiplicación y mejor calidad de plantas.

Cuadro 1. Análisis de varianza (cuadrado medios) de las características de brote y microcormo de gladiolo cv. 'Ámsterdam', por efecto de la frecuencia de inmersión en medio de cultivo.

F.V.*	G.L.	Número de brotes	Longitud de brotes (mm)	Número de raíz	Longitud de raíz (mm)	Número de microcormo	Diámetro de microcormo (mm)	Peso de microcormo (g)
TR	2	715.6**	44823.3**	196.08*	28.37	711.75**	1.12	0.013
Error	9	47.30	1843.52	38.1	90.7	33.64	0.49	0.004
R <sup>2</sup>		0.77	0.84	0.5	0.1	0.82	0.33	0.43
C.V. (%)		24.63	13.79	27.5	22.4	28.64	10.97	16.32
Promedio		27.92	311.44	22.41	42.42	20.25	6.37	0.37

\*F.V. = fuente de variación; TR = Tratamientos; G.L. = Grados de libertad; C.V.= Coeficiente de variación.

Con relación a la prueba de comparación de medias de las variables estudiadas, para número de brotes, se observó que hubo una relación inversa entre la frecuencia de inmersión y el número de brotes por explante; por lo que la mejor frecuencia de inmersión, fue de 4 h (41.25 brotes/explante) en comparación con los brotes obtenidos con 8 y 12 h, lo que representa diferencias de 30 y 60 % más brotes, respectivamente (Cuadro 2).

De manera similar a brotes por explante, el número de raíces por brote fue mayor (29.5) en la frecuencia de inmersión de cada 4 h que, en 8 y 12 h, lo que implica diferencias de 7 y 24 % menos raíces, respectivamente. También el número de microcormos fue mayor cuando se usó la frecuencia de inmersión de 4 h, ya que se obtuvieron 49.65 y 75.53 % más microcormos en comparación con los obtenidos en 8 y 12 h de inmersión, respectivamente (Cuadro 2).

La longitud de brotes fue mayor al utilizar la frecuencia de inmersión intermedia, es decir 8 horas, ya que al usar la frecuencia de 4 y 12 horas se obtiene 1.7 veces menor longitud de los brotes (Cuadro 2).

Por el contrario, la menor frecuencia de inmersión tuvo efecto favorable para el crecimiento de los microcormos, ya que éstos tuvieron 440 mg de peso, lo que implica 90 y 110 mg más que los obtenidos cuando la frecuencia de acceso al medio de cultivo fue de 4 y 8 h respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de brotes y microcormos de gladiolo cv. 'Ámsterdam' por efecto de tres frecuencias de inmersión en el medio de cultivo.

Frecuencia de inmersión (h)	Brotos por explante	Longitud de brotes (mm)	Raíces por brote (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Número de microcormos	Diámetro de microcormo (mm)	Peso de microcormo (g)
4	41.25 a*	252.50 b	29.50 a	40.00 a	34.75 a	6.57 a	0.35 ab
8	28.00 a	433.65 a	22.3 ab	42.0 a	17.5 b	5.77 a	0.33 b
12	14.50 b	248.18 b	15.5 b	45.3 a	8.5 b	6.77 a	0.44 a
DMS	11.00	68.68	9.87	15.23	9.27	1.11	0.09

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS= Diferencia mínima significativa.

Al respecto, Ruffoni et al. (2012), reportaron adecuados resultados en tasa de producción y calidad de microcormos al estudiar 7 genotipos de gladiolos híbridos cultivados en SIT con el sistema RITA<sup>®</sup>, y con tiempo de 3 minutos de inmersión cada 3 horas. De acuerdo con el genotipo, los autores obtuvieron de 4.2 a 18 brotes por explante, de 2.3 a 18 microcormos por explante, con diámetro de microcormo de 5.56 hasta 7.77 mm y peso de 0.123 hasta 0.380 g por microcormo. En el presente trabajo, los valores de número de brotes y número de microcormos por explante son superiores a los reportados por estos investigadores, mientras que el diámetro y peso de microcormos son similares.

Para cada especie, además de utilizar el SIT apropiado, el tiempo y la frecuencia de inmersión se deben definir para obtener los resultados deseados. La frecuencia con un min de inmersión durante la multiplicación *in vitro* de sábila (*Aloe barbadensis* Mill.) en el sistema RITA<sup>®</sup>, afectó el número de brotes de los explantes, con mayor efecto cuando se incrementó la frecuencia de 12 y 8 a 6 h, aunque la altura del explante no se vio afectada por la frecuencia de inmersión (Albany et al. 2015). Alvarenga y Salazar (2015) en micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en BIT con inmersión de 10 min cada 12 horas, produjeron la regeneración de plantas con siete veces mayor masa fresca y seca promedio respecto al control, además, con mayores tasas promedio de brotes. En otra investigación con BIT, utilizaron un ciclo de inmersión de un minuto por hora en la micropropagación de cultivares de *Eucalyptus*, sus resultados demostraron el potencial para el escalamiento y la automatización de micropropagación mediante la multiplicación de brotes y la embriogénesis somática en especies de árboles comerciales (Businge et al. 2017). En muchos casos, los protocolos de micropropagación son específicos para cada especie, pero además deben probarse en los diferentes cultivares, como es el caso de la obtención de plántulas sanas de avellana híbrida cultivados en sistemas de inmersión temporal (Latawa et al. 2016). Para la formación de bulbos de *Lilium* en SIT, los segmentos de bulbo se sumergieron en el medio de cultivo cuatro veces al día (frecuencia de 6 h) durante 15 min cada uno, lo que generó la producción rápida de bulbillos con una morfología bien definida y mayor tamaño (Lian et al. 2014). Definitivamente, las necesidades en cuanto a tiempo de inmersión en el medio de cultivo, así como la frecuencia, varían en función de la especie e incluso de la variedad de planta de interés.

### Evaluación del volumen de medio de cultivo

El análisis de varianza mostró efecto altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ) del volumen de medio de cultivo en número de brotes por explante, longitud de brote, número y peso de

microcormos (Cuadro 3). El efecto fue significativo ( $p \leq 0.05$ ) para número de raíces por brote, lo que indica la importancia de ajustar el volumen de medio por explante para alcanzar mayor número de microcormos; también mostró que la variación del volumen de medio de cultivo no influyó sobre la longitud de raíz y diámetro de microcormo.

Cuadro 3. Análisis de varianza (Cuadrado medios) de las características de brote, y microcormo de gladiolo cv. 'Ámsterdam' por efecto del volumen del medio de cultivo por explante.

F.V.	G.L.	Brotes por explante	Longitud de brotes (mm)	Raíces por brote	Longitud de raíz (mm)	Micro cormos	Diámetro de micro cormos (mm)	Peso de micro cormos (g)
TR	5	732.2**	22634.9**	155.9*	63.04	576.9**	0.55	0.016*
Error	18	57.52	1923.72	24.6	72.8	18.72	0.51	0.004
R <sup>2</sup>		0.77	0.76	0.6	0.2	0.89	0.23	0.53
C.V		23.51	14.97	19.3	20.7	18.88	11.15	16.37
Promedio		32.25	292.84	25.62	41.25	22.91	6.39	0.38

F.V. = fuente de variación; TR = Tratamientos; G.L. = Grados de libertad; C.V.= Coeficiente de variación.

Con relación al efecto del volumen de medio de cultivo por explante en las características de brotes y microcormos, se observó que el número de brotes por explante se incrementó en correspondencia al incremento del volumen de medio, 3.24 veces en comparación del menor volumen (27.8 mL/explante). El mejor resultado se obtuvo con 83.3 mL/explante, esto indica que al disponer de mayor cantidad de nutrientes por mayor volumen de medio de cultivo, los explantes generaron mayor número de brotes; aunque al disponer de 166.7 mL (doble cantidad de medio), la formación de estas estructuras de propagación fue ligeramente menor que con 83.7 mL por explante (Cuadro 4). Con respecto a la longitud de los brotes, se observó que ésta no presentó una tendencia definida y los brotes fueron de mayor longitud (43.3 cm) cuando estuvieron cultivados con 41.7 mL de medio de cultivo. El efecto del volumen de medio de cultivo en el número de raíces generó diferencias significativas entre los explantes que tuvieron menor volumen de medio (27.8, 33.3, 41.7) pues produjeron menor cantidad de raíces, en comparación con los de mayor volumen (55.6, 83.3, 166.7), que desarrollaron de 29 a 31 raíces, 50 % más raíces que los brotes cultivados en el menor volumen de medio de cultivo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características de brotes y microcormos de gladiolo cv. 'Ámsterdam' por efecto del volumen del medio de cultivo por explante.

Volumen de medio (mL/explante)	Brotes de por explante (Núm.)	Longitud de brotes (mm)	Raíces por brote (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Microcormo (Núm.)	Diámetro de microcormo (mm)	Peso de microcormo (g)
27.8	14.5 c*	248.1b	15.50 b	45.3 a	8.5 c	6.75 a	0.440 ab
33.3	19.5 c	230.3 b	24.0 ab	45.8 a	10.3 bc	6.65 a	0.495 a
41.7	28.0 bc	433.7 a	22.3 ab	42.0 a	18.8 b	5.77 a	0.332 b
55.6	41.3ab	252.5 b	29.5 a	40.0 a	34.8 a	6.57 a	0.353 ab
83.3	47.0 a	275.0 b	31.3 a	39.3 a	34.5 a	6.47 a	0.373 ab
166.7	43.3 ab	317.5 b	31.3 a	32.3 a	30.8 a	6.15 a	0.345 b
DMS	17.04	98.56	11.14	19.17	9.72	1.60	0.14

\*Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). DMS= Diferencia mínima significativa.

La longitud de raíz, así como el diámetro de microcormo no presentaron diferencias estadísticas significativas por efecto del volumen de medio en que estuvieron cultivadas, sin embargo, mostraron una tendencia a ser menores conforme se incrementó la cantidad de medio de cultivo (Cuadro 4).

La cantidad de microcormos formados se vio favorecida con el uso de más volumen de medio de cultivo (55.6, 83.3, 166.7 mL), indicando que a menor número de explantes por frasco, aumentó la cantidad de microcormos por explante. Se obtuvo la mayor producción de estas estructuras de propagación (34.8 microcormos) al usar 55.6 mL de medio nutritivo, con una diferencia de cuatro veces más microcormos en comparación a los obtenidos con volumen de 27.8 mL, y 1.9 veces más con relación al uso de 41.7 mL. El peso de microcormo no presentó tendencia de incremento o decremento por efecto de la variación en el volumen de medio de cultivo, los microcormos de mayor peso fueron aquellos cultivados en frascos con 33.3 mL de medio por explante.

El efecto del medio de cultivo por explante en la multiplicación de brotes, formación de raíces y microcormos en BIT puede variar por la cantidad de nutrientes que aporta durante el cultivo *in vitro*. En palma datilera cultivada en SIT, Othmani et al. (2017), indicaron que esta tecnología tiene el potencial de producir grandes cantidades de plantas de manera económica y eficiente, debido al contacto directo del medio de cultivo con el material vegetal y la renovación del ambiente de cultivo que ocurre en cada inmersión, logrando la reducción de asfixia, necrosis de tejido y fenómenos de hiperhidratación. Al respecto, Mosqueda et al. (2016), comprobaron que el volumen de medio de cultivo influye en la multiplicación *in vitro* de gerbera en SIT, y determinaron que 40 mL de medio de cultivo por explante incrementó el número de brotes, la masa fresca y el contenido de agua de los explantes, mejorando su calidad morfo-fisiológica. Por su parte, De Feria et al. (2013), comprobaron que el uso de BIT con una relación de 10 mL de medio de cultivo por explante, influye en la multiplicación de gerbera, e incrementa el número de brotes; estos autores comentan que este comportamiento puede estar relacionado entre otras causas con la disponibilidad de nutrientes, y entre mayor sea la relación de medio de cultivo por explante, se tendrá mayor disponibilidad de nutrientes y con ello una mayor estimulación de los explantes a multiplicarse.



García-Ramírez et al. (2016) en *Bambusa vulgaris* Schrad cultivado en condiciones *in vitro* utilizando BIT, observaron que al reducir la densidad de inóculo (incremento en el volumen de medio de cultivo por explante) de 18 a 12 explantes por frasco, el número de brotes, la longitud del brote principal, el número de hojas y la clorofila aumentaron, debido posiblemente a una relación óptima entre el explante y el medio de cultivo, así como la aeración en los frascos. Para evaluar la eficiencia del sistema BIT en la producción de clones de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., se usaron 21 explantes con 300 mL (14.28 mL por explante) de medio de cultivo y tiempo de inmersión de 15 min cada 2 h; los autores evaluaron las condiciones de incubación en la obscuridad durante 15 días, y evaluaron número y largo de brotes (Mendonça et al. 2016). También, Rocano et al. (2017) evaluaron la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotropica* Diels en el sistema BIT, para lo cual utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 2 L con 300 mL de medio de cultivo y 10 explantes y tiempo de inmersión de 2 minutos cada 6 horas; en general, el sistema de inmersión BIT produjo un número de brotes equivalente, con características similares a los obtenidos en el método convencional en medio semisólido; sin embargo, los BITs produjeron más brotes.

Basail et al. (2015) obtuvieron los mejores resultados con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia de inmersión cada 3 horas, con 40 mL de medio de cultivo por explante en cuanto al coeficiente de multiplicación (15.99) de brotes de yemas axilares en el cultivar de plátano 'CEMSA ¾' (AAB) en SIT; los brotes con mayor longitud se obtuvieron con 41.7 mL de medio de cultivo por explante.

La técnica de propagación masiva haciendo uso de BIT, representa una alternativa eficiente para la producción de "semilla" de calidad, principalmente en aquellas especies donde la oferta de plantas es baja mediante la aplicación de métodos tradicionales de propagación (Albarrán et al. 2014). Como se pudo comprobar en este trabajo de investigación en gladiolo, la eficiencia del BIT para la producción de microcormos, sin necesidad de hacer subcultivos y poder realizar la cosecha directamente del biorreactor, está directamente ligada a determinar la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo.

## CONCLUSIONES

Con base en las condiciones de cultivo y los resultados obtenidos, se determinó que el uso de Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) es un sistema eficiente de propagación con parámetros de operación de tiempo de inmersión de 3 min con frecuencias de 4 h y un volumen de medio de cultivo de 55.6 mL por explante, que podrían apoyar exitosamente al escalamiento en una explotación comercial de microcormos de gladiolo cv. 'Ámsterdam'.

## LITERATURA CITADA

- Aguirre G, Pierre J, Leigue L. 2016. Aplicación del cultivo de tejidos en la multiplicación y conservación de los recursos fitogenéticos. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.
- Albany NR, Vilchez JA, León S, Nava AR, Martínez LJ, Molina. 2015. Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). Revista Colombiana de Biotecnología 17: 24-31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669>
- Albarrán J, Salazar E, Trujillo I, Vegas A, González A, Díaz A, Vallejo E, Castro L, Torrealba A, Silva A. 2014. Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. IINIA Divulga 28: 2-8.

- Alvarenga S, Salazar T. 2015. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales* 36: 50-57.
- Basail, M., V. Medero, Y. Torres, A. Jiménez, J López, A. Santos.,A. Raya, M. Bauta, Y. Beovides, Y. Gutiérrez, Y. 2015. Multiplicación del cultivar de plátano ‘CEMSA ¾’ (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Agricultura Tropical* 1: 32-41.
- Businge E, Trifonova A, Schneider C, Rödel P, Egertsdotter U. 2017 Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of eucalyptus, birch and fir. *Forests* 8: 196. <https://doi.org/10.3390/f8060196w>
- Cañal MJ, Rodríguez R, Fernández B, Sánchez-Tames R, Majada JP. 2001. Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal* 1: 3-9.
- De Feria M, Chávez M, Quiala E, Jiménez E. 2003. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación in vitro de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 3: 149-154.
- Escalona M, Aragon CA, Capote I, Pina D, Ceja I, Rodríguez R, Debergh P. 2007. Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. *Acta Horticulturae* 748: 95-101. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.748.9>
- Etienne H, Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215-231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- García-Ramírez Y, González-González M, Torres-García S, Freire-Seijo M, Pérez M, Trujillo Á, Rivero L. 2016. Efecto de la densidad de inóculo sobre la morfología y fisiología de los brotes de *Bambusa vulgaris Schard. ex Wendl* cultivados en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 16: 231-237.
- Latawa J, Shukla MR, Saxena PK. 2016. An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. *Botany* 94: 1-8. <https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0111>
- Lian ML, Piao X-C, Park S-Y. 2014. Mass production of *Lilium* bulblets in bioreactors. In: Paek K-Y, Niranjana H, Zhong J-J, editores. *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. Dordrecht, Springer. P. 390-415. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_16)
- Mendonça EG, Stein VC, de Carvalho HH, Santos BR, Beijo LA, Paiva LV. 2016. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. *Ciência Florestal* 26: 1211-1224.
- Mosqueda O, Escalona MM, Da quinta MA. 2016. Efecto del tiempo de cultivo y volumen de medio de cultivo por explante en la multiplicación de *Gerbera jamesonii* en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 16: 3-11.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Othmani, A.,Ch. Bayoudh, A. Sellemi and N. Drira (2017) Temporary Immersion system for date palm micropropagation. In: Al-Khayri J, Jain S, Johnson D, editores. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I. Methods in Molecular Biology*. Nueva York. Humana Press. P. 240-249. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_20)

- Oviedo-Pereira D, Alvarenga S, Evangelista S, Sepúlveda G, Rodríguez-Monroy M. 2015. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Beroni, un cultivo promisorio para México. *BioTecnología* 19:14-27
- Rocano MN, Villena PG, Peña DF. 2017. Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación in vitro de *Juglans neotropica*. *MASKANA* 8: 103-109. <https://doi.org/10.18537/mskn.08.01.09>
- Rosales C, Brenes J, Salas K, Arce-Solano S, Abdelnour-Esquivel A. 2018. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(1):69-84. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.08.028
- Ruffoni B, Savona M. 2005. The Temporary Immersion System (T.I.S.) for the improvement of micropropagation of ornamental plants. *Acta Horticulturae* 683: 445-449. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.683.59>
- Ruffoni B, Savona M, Barberini S. 2012. Biotechnological support for the development of new *Gladiolus* hybrids. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 1: 45-52.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT Version 9.00. User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, Estados Unidos.