



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**NANOPARTÍCULAS DE Ag PARA EL CULTIVO ASÉPTICO Y
PRODUCCIÓN DE CORMOS DE GLADIOLO EN TRES
SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL**

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA

DIRECTOR

Dra. María Andrade Rodríguez



Cuernavaca, Morelos, a 29 de octubre de 2019

NANOPARTÍCULAS DE Ag PARA EL CULTIVO ASÉPTICO Y PRODUCCIÓN DE CORMOS
DE GLADIOLO EN TRES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO*

Tesis realizada por **José Antonio Chávez García** bajo la dirección y Comité Revisor indicado,
aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: _____
Dra. María Andrade Rodríguez

Revisor: _____
Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres

Revisor: _____
Dr. Porfirio Juárez López

Revisor: _____
Dr. Manuel de Jesús Sainz Aispuro

Revisor: _____
Dr. Dagoberto Guillén Sánchez

Revisor: _____
Dr. Héctor Sotelo Nava

Revisor: _____
Dr. Francisco Perdomo Roldan

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo que me permitió formarme en el mundo de la investigación.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por contribuir a mi formación a lo largo de estos cuatro años.

Al Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca FIRA por el acceso a las instalaciones y apoyo para esta tesis.

Agradezco de manera especial a la Dra. María Andrade Rodríguez por su interés, aportaciones, enseñanzas y acertada dirección. Gracias por confiar en mí.

Al Dr. Jericó Jabín Bello Bello, por su valiosa participación y apoyo para la realización del presente trabajo.

A mis asesores: Dr. Oscar Gabriel Villegas Torres, Dr. Porfirio Juárez López, Dr. Manuel de Jesús Sainz Aispuro, Dr. Dagoberto Guillén Sánchez, Dr. Héctor Sotelo Nava, Dr. Francisco Perdomo Roldan, por su supervisión, disponibilidad, apoyo y sugerencias en la realización del presente trabajo.

Al Ing. Marco Antonio Guzmán Noguera por su valiosa colaboración y apoyo para la realización de este proyecto.

Al Biol. Ricardo Flores Olascoaga por sus aportaciones apoyo y guía para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia por todo su amor y apoyo, porque influyen en mi vida para llenarla y darle sentido.

A mi esposa: Claudia

A mis hijos: Javier y Ulises

A mis padres: Guillermo y Ramona

A mis hermanos: Carlos y Guillermo

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Objetivo general	4
1.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Hipótesis.....	5
2. CAPÍTULO 1. NANOPARTÍCULAS DE PLATA (NPsAg) EN EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES DE GLADIOLO.....	6
2.1. RESUMEN.....	6
2.2. SUMMARY	7
2.3. INTRODUCCIÓN.....	8
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.4.1. Nanopartículas de plata como agente desinfectante de explantes de gladiolo <i>in vitro</i>	10
2.4.2. Nanopartículas de plata como agente antimicrobial en el medio de cultivo	11
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
2.5.1. Nanopartículas de plata como agente desinfectante de explantes de gladiolo <i>in vitro</i>	12
2.5.2. Nanopartículas de plata como agente antimicrobial en el medio de cultivo	15
2.6. CONCLUSIONES.....	18
2.7. LITERATURA CITADA	18
3. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE TRES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> PARA LA MULTIPLICACIÓN DE MICROCORMOS DE GLADIOLO.....	21
3.1. RESUMEN.....	21
3.2. SUMMARY	22
3.3. INTRODUCCIÓN.....	23
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.6. CONCLUSIÓN.....	30

3.7. LITERATURA CITADA	30
4. CAPITULO 3. FRECUENCIA DE INMERSIÓN Y VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO PARA LA FORMACIÓN DE MICROCORMOS DE GLADIOLO EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL BIT.....	33
4.1. RESUMEN.....	33
4.2. SUMMARY	34
4.3. INTRODUCCIÓN.....	35
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.4.1. Sistema de Inmersión Temporal (BIT).....	37
4.4.2. Material vegetal.....	37
4.4.3. Frecuencia de inmersión	37
4.4.4. Volumen de medio de cultivo	39
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.5.1. Frecuencia de inmersión	40
4.5.2. Volumen de medio de cultivo	43
4.6. CONCLUSIONES.....	48
4.7. LITERATURA CITADA	48
5. CONCLUSIONES GENERALES	52
6. RECOMENDACIONES.....	52
7. LITERATURA CITADA EN INTRODUCCIÓN GENERAL.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
2.1 Efecto de la concentración de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento <i>in vitro</i> de gladiolo.	13
2.2 Efecto del tiempo de exposición de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento <i>in vitro</i> de gladiolo.	14
2.3 Efecto de la concentración de NPsAg en el medio de cultivo para el establecimiento <i>in vitro</i> de gladiolo.	16
3.1 Características de brotes y microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' en tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	27
4.1 Análisis de varianza (cuadrado medios) de las características de brote, y microcormo de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto de la frecuencia de inmersión en el medio de cultivo.	41
4.2 Características de brotes y microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto de tres frecuencias de inmersión en el medio de cultivo.	42
4.3 Análisis de varianza (Cuadrado medios) de las características de brote, y microcormo de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto del volumen del medio de cultivo por explante.	44
4.4 Características de brotes y microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto del volumen del medio de cultivo por explante.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Planta de gladiolo	1
2.1 Efecto de la concentración de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de gladiolo, seis semanas después del establecimiento (barra = 1.0 cm). A: 25 mg L ⁻¹ , B: 50 mg L ⁻¹ , C: 100 mg L ⁻¹ , D: 200 mg L ⁻¹	13
2.2 Efecto de la concentración de NPsAg en combinación con el tiempo de inmersión en el establecimiento <i>in vitro</i> de gladiolo (DMS = 9.57).....	15
2.3 Efecto de la concentración de NPsAg en el medio de cultivo para el establecimiento <i>in vitro</i> de gladiolo.....	17
3.1 Efecto de tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en gladiolo var. <i>Ámsterdam</i> . A: Semisólido, B: Inmersión parcial, C: Biorreactores de Inmersión temporal (BIT), D: Microcormos obtenidos en BIT	29
4.1 Efecto de frecuencias de inmersión (3 minutos de inmersión cada 4, 8 y 12 horas), en el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT), en gladiolo var. ' <i>Ámsterdam</i> '.....	41
4.2 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante, en el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT), en la producción de microcormos de gladiolo var. ' <i>Ámsterdam</i> '.	45

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La cultura de la floricultura en México ha estado presente desde antes de la colonización, las civilizaciones que habitaron el territorio cultivaban flores, que usaban en la mayoría de sus festividades religiosas, así como para decorar sus hogares, tanto interna como externamente. Sin embargo, y pese a que en México existen las condiciones para el desarrollo de la floricultura con altos estándares de calidad, éste no figura como uno de los productores más importantes a nivel mundial, ni siquiera con sus principales socios comerciales que son Estados Unidos y Canadá (Claridades Agropecuarias, 2016).

El gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* L.) es originario del mediterráneo y África austral. Este género se integra por alrededor de 180 especies nativas de África, Madagascar, Europa, Arabia y oeste de Asia. Los gladiolos entre los que destacan *Gladiolus x hybridus*, *G. x hortulanus*, y *G. x grandiflorus*, pertenecen a la familia Iridaceae, son plantas herbáceas (Figura 1) que se desarrollan a partir de un cormo subterráneo (Ramírez y Chávez, 2014); actualmente, se conoce una gran diversidad de tamaños de ejes florales, colores y formas de flores de gladiola (Buschman, 1989).

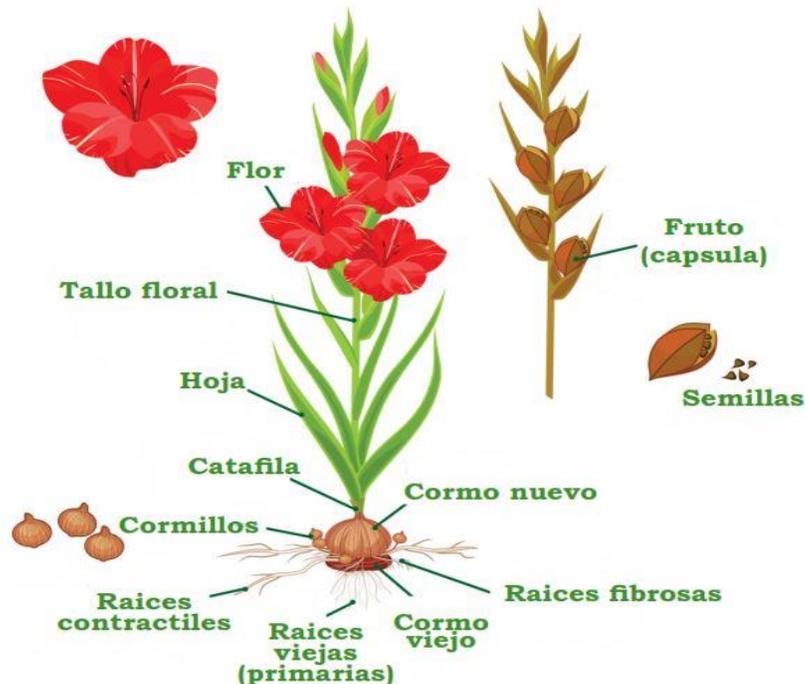


Figura 1. Planta de gladiolo

La producción de gladiola en México se realiza en los estados de Puebla, estado de México, Morelos, Michoacán, Guerrero, Veracruz y Oaxaca; la superficie sembrada fue de 1791.2 ha en Puebla y 1266.1 ha en el estado de México, estos son los estados con mayor superficie sembrada; el estado de Morelos destina 641.6 ha para la producción de gladiola, mientras que Michoacán establece 497 ha con este cultivo; el estado de Guerrero sólo ocupa 301.9 ha, Veracruz y Oaxaca son los estados que menos superficie plantan con 95 y 13 ha respectivamente (SIAP, 2019). El valor total de la producción en el año 2008 fue de \$ 17,618,882.00 pesos y en el año 2017 fue de \$ 28,182,258.00 pesos, lo que representó un incremento de 60 % en 10 años; el mayor valor en todos los años corresponde a las exportaciones realizadas hacia Estados Unidos de América; en los últimos 7 años las exportaciones realizadas a dicho país fueron en promedio 7.44 veces más que las que se realizaron a Canadá (INEGI, 2019).

La gladiola tiene una gran demanda en el mercado internacional de flores cortadas, se cultiva comercialmente a partir de cormos, tanto para las espigas de floración como para la producción de cormos, se propaga principalmente por la multiplicación natural de nuevos cormos y cormillos. La calidad de la gladiola como flor de corte, depende en gran medida del cormo que se usa como estructura de reproducción vegetativa; los países especializados en su producción y distribución son Holanda, Francia, Chile y Estados Unidos de América. Cuando los productores requieren renovar su plantación, acuden a casas comercializadoras o con productores de la misma zona para la adquisición del nuevo material. Sin embargo, no se garantiza la sanidad del cormo (Hernández-Moreno *et al.*, 2017), y hay un suministro insuficiente de material de siembra (Mahasen *et al.*, 2015). La producción comercial de cormos y cormillos también se ve muy afectada por la pudrición del cormo ocasionada por *Fusarium* y por el alto porcentaje de deterioro de los cormos durante el almacenamiento. Esta producción comercial de cormos y cormillos no satisface la demanda local de material de siembra y afecta el costo del cormo. Otro problema es la inactividad de los cormos y los cormillos (Memon *et al.*, 2016). En México, no existe ninguna empresa que produzca material vegetativo de gladiola que garantice que esté libre de virus y enfermedades, y menos aún en la cantidad que satisfaga la demanda de las principales zonas productoras de flor cortada. Este último es uno de los problemas más serios que

ha ocasionado que la producción del gladiolo dependa de la importación de material vegetativo proveniente de Holanda y Brasil.

La propagación *in vitro* de plantas por los métodos tradicionales satisface varios de estos requerimientos, pero requiere de personal especializado, de laboratorios acondicionados para tales fines y de insumos costosos. La tecnología de biorreactores denominada Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) es una opción viable que ofrece considerables ventajas para la propagación *in vitro* de plantas bajo el enfoque de las tecnologías apropiadas (Muñiz, 2018).

Dada la problemática planteada para la producción de gladiola en México, es posible aplicar herramientas biotecnológicas de propagación *in vitro* en la reproducción del gladiolo a través del uso de los sistemas de cultivo líquido o biorreactores simples, tales como el sistema de inmersión temporal, para reducir los costos de producción y para mejorar la tasa de multiplicación y calidad del microcormo. Los Sistemas de Inmersión Temporal consisten en el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos de manera temporal a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones asépticas y controladas; es decir, son recipientes diseñados específicamente para la producción a gran escala de células, tejidos u órganos; dentro de estos sistemas, se encuentra el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) diseñado y validado por Escalona *et al.* (1999).

Por lo antes mencionado, el trabajo de investigación que se presenta en esta tesis es de gran impacto para el sector florícola regional, nacional e internacional, dado que se busca contar con un protocolo para producir material vegetativo que permita tener independencia de material de propagación importado, ya que con el sistema de biorreactores se podrá disponer de la cantidad de cormos comerciales en menor tiempo en comparación con la micropropagación convencional. Con base a lo anterior, se llevó a cabo esta investigación con gladiolo (*Gladiolus* sp. variedad 'Ámsterdam') para evaluar nanopartículas de plata como agente desinfectante, tres sistemas de cultivo *in vitro*, determinar la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo necesarios para la producción de microcormos usando el sistema BIT. Para cumplir

con las expectativas anteriores, se plantearon el objetivo general y los objetivos específicos siguientes:

1.1. Objetivo general

Generar un protocolo de propagación *in vitro* de gladiolo var. 'Ámsterdam' con la finalidad de incrementar la tasa de multiplicación y calidad de microcormos utilizando biorreactores de inmersión temporal (BIT).

1.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de cinco concentraciones de nanopartículas de plata (NPsAg): 0, 25, 50 100 y 200 mg L⁻¹ como agente desinfectante de los ápices de gladiolo en el establecimiento *in vitro*, en combinación con cuatro tiempos de exposición (5, 10, 15 y 20 min).
2. Evaluar el efecto de cinco concentraciones de nanopartículas de plata (NPsAg): 0, 25, 50 100 y 200 mg L⁻¹ como agente desinfectante del medio de cultivo para el establecimiento *in vitro*.
3. Evaluar tres sistemas de cultivo *in vitro* usando medio semisólido, inmersión parcial y medio líquido [en biorreactores de inmersión temporal (BIT)], para la producción de microcormos de gladiolo.
4. Evaluar el efecto de tres frecuencias de inmersión, 4, 8 y 12 horas, usando el sistema BIT, para la producción de microcormos de gladiolo.
5. Determinar el efecto de tres volúmenes de medio de cultivo (27.7, 33.3, 41.6, 55.5, 83.3, 166.6 mL por explante) en el BIT para la producción de microcormos de gladiolo.

1.3. Hipótesis

1. El efecto de 50 mg L⁻¹ en combinación con 15 minutos de inmersión de nanopartículas de plata (NPsAg) como agente desinfectante de los ápices de gladiolo será el óptimo para obtener el cultivo aséptico.
2. El efecto de 50 mg L⁻¹ de nanopartículas de plata (NPsAg) como parte del medio de cultivo será adecuado para tener el medio de cultivo libre de agentes contaminantes durante el establecimiento *in vitro* de gladiolo.
3. El sistema de inmersión temporal BIT será mejor para la obtención de mayor cantidad de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' en comparación con el sistema semisólido y el de inmersión parcial.
4. En el sistema de inmersión temporal BIT con 3 min de inmersión y una frecuencia de 8 horas se obtendrán los mejores resultados para la producción de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.
5. En el sistema de inmersión temporal BIT con el volumen de medio de cultivo de 55.5 mL por explante se obtendrán los mejores resultados para la producción de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.

Para cumplir con los objetivos descritos anteriormente y dar respuesta a las hipótesis, se realizó la presente investigación cuyos resultados se integraron en tres capítulos, mismos que se presentan a continuación.

2. CAPÍTULO 1. NANOPARTÍCULAS DE PLATA (NPsAg) EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE ÁPICES DE GLADIOLO

José Antonio Chávez-García¹, María Andrade-Rodríguez^{1*}, Dagoberto Guillén-Sánchez¹ Jericó Jabín Bello-Bello², Ricardo Flores-Olascoaga³

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

²Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Córdoba, Km 348 carretera federal Córdoba-Veracruz, Congregación Manuel León. C.P. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

³Centro de Desarrollo Tecnológico "Tezoyuca" FIRA, Km 12.5, carretera Zapata-Zacatepec, C.P. 62765, Emiliano Zapata, Morelos, México

*Autor para correspondencia (maria.andrade@uaem.mx)

2.1. RESUMEN

La micropropagación de plantas puede ser limitada por varios factores como la contaminación *in vitro*. La desinfección en la etapa de establecimiento es uno de los pasos más importantes en la prevención de la contaminación bacteriana y fúngica. Las nanopartículas de plata (NPsAg), son un material que muestra alta capacidad en la eliminación de microorganismos. Los objetivos de esta investigación fueron evaluar el efecto de las NPsAg como auxiliar en la desinfección de ápices de gladiolo y en la desinfección del medio de cultivo. Se aplicó NPsAg, como auxiliar en la desinfección de explantes, en cuatro concentraciones (25, 50, 100, 200 mg L⁻¹) y se combinaron con cuatro tiempos de inmersión (5, 10, 15, 20 min.). Por otro lado, se utilizaron las NPsAg en cinco concentraciones (0, 25, 50, 100, 200 mg L⁻¹), como parte del medio de cultivo para evitar el crecimiento de microorganismos. Se observó que con 50 mg L⁻¹ de NPsAg se obtuvo el mayor porcentaje de asepsia (91.67 %), y la mejor longitud del brote (28.62 mm). El tiempo

de inmersión de 5 a 20 minutos de los explantes en NPsAg no tuvo efecto en la asepsia de los mismos, pues el resultado fue similar en los cuatro tiempos de inmersión. El análisis de interacción de factores, sugiere que 50 mgL⁻¹ durante 15 minutos fue el mejor tratamiento. La desinfección del medio de cultivo con 25, 50, 100, 200 mg L⁻¹ de NPsAg generó 100 % de asepsia en los recipientes con el medio de cultivo, en tanto que el control, sin NPsAg, mostro 80 % de contaminación con microorganismos. El uso de 50 mg L⁻¹ generó una longitud del brote 35.5 % mayor, en comparación con el control sin NPsAg.

Palabras clave: Desinfección de explantes, Agente desinfectante, *Gladiolus* sp.

2.2. SUMMARY

Plant micropropagation can be limited by several factors, the most important being *in vitro* contamination. Disinfection at the establishment stage is one of the most important steps in the prevention of bacterial and fungal contamination. NPsAg is a new non-toxic material that shows high capacity in the elimination of microorganisms. The objectives of this research were to evaluate the effect of NPsAg as an auxiliary in the disinfection of gladiolus apices and in the disinfection of the culture medium. NPsAg was applied as an aid in the disinfection of explants in four concentrations (25, 50, 100, 200 mgL⁻¹), they were combined with four immersion times (5, 10, 15, 20 min.). In addition, the NPsAg in five concentrations (0, 25, 50, 100, 200 mgL⁻¹) were used as part of the culture medium to prevent the growth of microorganisms. It was observed that with 50 mgL⁻¹ of NPsAg the highest percentage of asepsis (91.67 %) was obtained, and the best shoot length (28.62 mm) was obtained. The immersion time of 5 to 20 minutes of the explants in NPsAg had no effect on the asepsis of explants, since the result was similar in the four times of immersion. Factor interaction analysis suggests that 50 mgL⁻¹ for 15 minutes was the best treatment. The disinfection of the culture medium with 25, 50, 100, 200 mg L⁻¹ of NPsAg generated 100 % asepsis in the containers with the culture medium, while the control showed 80 % contamination with microorganisms. The use of 50 mg L⁻¹ generated a 35.5% longer sprout length, compared to the control without NPsAg.

Index words: Disinfection of explants, Disinfectant agent, *Gladiolus* sp.

2.3. INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* de gladiolo, es una alternativa a los métodos convencionales de propagación, aumenta la tasa de multiplicación y genera material libre de patógenos. Sin embargo, se ve limitada por la contaminación causada por microorganismos (hongos, bacterias, entre otros), su presencia en el medio axénico provoca competencia por nutrientes, modificación del medio de cultivo, producción de compuestos tóxicos, reducción en la tasa de inducción de brotes y raíces o la destrucción del explante (Levitus *et al.*, 2010; Al-Ani, 2011; Memon *et al.*, 2012; Arab *et al.*, 2014; Bernard, 2015).

Recientemente, se ha impulsado el uso de NPsAg, como una alternativa a los procedimientos químicos comunes para el control de contaminantes *in vitro* durante la producción de brotes, con menor probabilidad de que los microorganismos generen resistencia, en comparación con los antibióticos, ya que la plata ataca a una amplia gama de objetivos en los microbios; además, no causa fitotoxicidad (Rai *et al.*, 2008; Rosstami y Shahsavar, 2009; Taghizadeh y Solgi, 2014). El mecanismo de la fuerte actividad antimicrobiana de las NPsAg está relacionado con el tamaño de la partícula y la superficie de contacto, con los cambios estructurales que provoca en la membrana bacteriana, con su interacción con los grupos fosforilados y azufrados de varios compuestos y con la disrupción en la producción de adenosín trifosfato (ATP) y replicación del ADN (Pal *et al.*, 2007; Monge, 2009; Durán *et al.*, 2010). La actividad biocida de las NPsAg se ha probado en más de 600 microorganismos (Bernard *et al.*, 2015).

Entre los métodos físicos más comunes para la desinfección está la aplicación de calor húmedo mediante el uso de la autoclave. La desinfección química se realiza generalmente con agentes químicos, que pueden ser desinfectantes o antisépticos compatibles con los tejidos biológicos (Pérez-Uz *et al.*, 2010). Existen algunos métodos y productos químicos disponibles para controlar estas contaminaciones; sin embargo, la eficiencia de su uso es todavía limitada o son tóxicos. También se usan antibióticos para controlar las contaminaciones por bacterias, aunque pueden afectar

el desarrollo y la respuesta de los explantes induciendo resistencia en las bacterias (Rosttami y Shahsavari, 2009; Al-Ani, 2011; Safavi, 2012).

Con el progreso de la nanotecnología y el desarrollo de nuevas nanopartículas metálicas de plata, se abre la posibilidad de utilizar estas modernas alternativas en el control de patógenos. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antimicrobial de las NPsAg en el establecimiento de explantes de gladiolo *in vitro*, así como evaluar el efecto de cinco concentraciones de NPsAg como agente desinfectante del medio de cultivo.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Centro de Desarrollo Tecnológico “Tezoyuca” del FIRA (Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura), en Tezoyuca, Morelos, México. La investigación constó de dos experimentos.

Se usaron cormos de gladiolo var. ‘Ámsterdam’ de un lote comercial para producción de flor de corte de un productor de la zona poniente del estado de Morelos. Se utilizaron macetas de 15.2 cm de diámetro en donde se colocó tepojal como sustrato, con granulometría de 5 mm; se plantaron los cormos y se aplicó riego diariamente por 25 días. Cuando brotaron las yemas y tuvieron de 1.5 a 2.0 cm de altura, se lavaron los cormos y se aislaron los ápices cortando desde la base (con parte del tallo madre) y se obtuvieron explantes de 7 mm de diámetro de base y 1.5 cm de altura. Los explantes se sumergieron en una solución de agua desmineralizada con hipoclorito de sodio al 3 %, más 0.5 g L⁻¹ de detergente, los explantes se mantuvieron en agitación constante por cinco minutos. Posteriormente, en condiciones de asepsia, los ápices fueron colocados por 18 minutos en una solución de agua destilada estéril con hipoclorito de sodio al 10 %; posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se usaron para evaluar el efecto de las NPsAg.

2.4.1. Nanopartículas de plata como agente desinfectante de explantes de gladiolo *in vitro*

La adición de NPsAg se utilizó como auxiliar en el método de desinfección de ápices de gladiolo durante el establecimiento *in vitro*. El producto utilizado en esta investigación fue AgROVIT-CP, son nanopartículas de plata esféricas de 35 ± 15 nm, funcionalizadas con polivinilpirrolidona (PVP, 10-30 kD). La solución madre original AgROVIT-CP al 20 % corresponde a una concentración de 1.2 % (peso) de plata metálica (COLPOS-Córdoba, 2014). Las NPsAg se prepararon con agua desmineralizada estéril.

Después de la desinfección con hipoclorito de sodio, se formaron 16 grupos de ápices para evaluar el efecto de cuatro concentraciones de NPsAg (25, 50, 100 y 200 mgL^{-1}) en combinación con cuatro tiempos de inmersión de los explantes (5, 10, 15, y 20 min) en la asepsia de los explantes de gladiolo. Al finalizar cada tratamiento, se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

El medio de cultivo usado fue Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas: tiamina, piridoxina, glicina y ácido nicotínico (1 mg L^{-1}), 120 mg L^{-1} de inositol, 2 mg L^{-1} de BA, 3 % de sacarosa, 0.75 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. Como recipiente de cultivo se usaron tubos de ensayo (150 x 25 mm, capacidad de 55 mL) y se dosificaron 20 mL de medio de cultivo en cada uno, el medio de cultivo se esterilizó a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 18 min.

Después de aplicados los tratamientos con NPsAg a los ápices, con ayuda de un microscopio estereoscópico, se eliminaron las hojas de cada explante hasta que se obtuvieron ápices de 4 mm aproximadamente y se estableció un ápice por tubo de cultivo. Los tubos con los explantes se colocaron en incubación a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura, 16 horas de iluminación y 8 horas de oscuridad; la irradiancia fue de $32 \text{ } \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (4 x 4) y seis repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió en un tubo de ensayo con un explante.

Tres semanas después del establecimiento *in vitro* se evaluó la asepsia de los explantes y medio de cultivo, a las seis semanas se midió la longitud del brote (mm), número de brotes por explante y contenido de clorofila (unidades SPAD) (SPAD-502 Plus, Fledscout®).

2.4.2. Nanopartículas de plata como agente antimicrobial en el medio de cultivo

Se preparó medio de cultivo MS (1962) suplementado con vitaminas: tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico (1 mg L^{-1}), 120 mg L^{-1} de inositol, 2 mg L^{-1} de BA, 3 % de sacarosa, 0.75 % de agar; el pH se ajustó a 5.7. El medio se colocó en matraces de 250 mL y se calentó hasta punto de ebullición, hirvió durante al menos 5 min. Las NPsAg se incorporaron al medio de cultivo en la concentración requerida para cada tratamiento ($0, 25, 50, 100, 200 \text{ mg L}^{-1}$) cuando este tuvo una temperatura aproximada de 75 a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se agitó manualmente para homogeneizar las NPsAg; inmediatamente después se sirvieron alícuotas de 20 mL en tubos de ensayo (previamente esterilizados por 18 minutos a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$); el proceso de dosificación del medio se realizó en la campana de flujo laminar. Una vez solidificado el medio de cultivo, se estableció un explante por tubo. Los tubos fueron incubados en las condiciones descritas en el experimento anterior.

El experimento se estableció bajo un diseño experimental completamente al azar, con cinco tratamientos y 10 repeticiones; tres semanas después se evaluó la asepsia de los explantes y medio de cultivo, a las seis semanas se midió la longitud del brote (mm), número de brotes por explante y contenido de clorofila (unidades SPAD) (SPAD-502 Plus, Fledscout®).

Los datos obtenidos de ambos experimentos fueron estudiados mediante análisis de varianza y la prueba de comparación de medias LSD (DMS, $P \leq 0.05$); se usó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, SAS Inc. 2009).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Nanopartículas de plata como agente desinfectante de explantes de gladiolo *in vitro*

La mayor incidencia de microorganismos se presentó cuando los explantes se desinfectaron con 25 mg L⁻¹ de NPsAg; en tanto que el uso de 50 y 100 mg L⁻¹ generó la mayor asepsia, misma que fue 20.74 % más alta que con 25 mg L⁻¹. Sin embargo, al usar la mayor cantidad de NPsAg la asepsia fue 8.33 % menor que con 50 y 100 mg L⁻¹ (Cuadro 2.1); esto indica que 50 y 100 mg L⁻¹ son las mejores concentraciones de NPsAg para obtener la asepsia de explantes de gladiolo.

El número de brotes por explante, el diámetro de los brotes y el contenido de clorofila no presentaron diferencias por efecto de la concentración de NPsAg usada para la desinfección de los explantes.

La longitud del brote fue mayor al desinfectar los explantes con 50 mg L⁻¹ de NPsAg; en contraste, la menor longitud de brotes se tuvo al usar 100 mg L⁻¹, el resultado también muestra que, aunque sin diferencias estadísticas, el número de brotes por explante y contenido de clorofila tuvieron mayor valor al usar 50 mg L⁻¹ del NPsAg (Cuadro 2.1, Figura 2.1); lo anterior permite señalar que 50 mg L⁻¹ fue la concentración de NPsAg más adecuada para la desinfección de los explantes de gladiolo, así como para el crecimiento inicial de los ápices.

Con respecto al tiempo de exposición a las NPsAg, se observó que no hubo efecto significativo para la asepsia y contenido de clorofila de los explantes pues los resultados son estadísticamente iguales (Cuadro 2.2), lo que indica que el tiempo de exposición de 5 a 20 minutos de inmersión de los explantes en NPsAg no fue suficiente para una desinfección eficiente. Al respecto Abdi *et al.* (2008), realizaron un experimento para evaluar el potencial de las nanopartículas de plata (25, 50 y 100 mg L⁻¹) en tres tiempos de inmersión 30, 60 y 180 min, para eliminar bacterias de explantes nodales de valeriana, observaron que 100 mg L⁻¹ por 180 min de inmersión generó 89 % de explantes asépticos; señalaron que las NPsAg no afectaron el crecimiento

Cuadro 2.1. Efecto de la concentración de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de gladiolo.

Concentración de NPsAg (mg L ⁻¹)	Asepsia (%)	Brotos por explante (Núm.)	Diámetro de brote (mm)	Longitud de brote (mm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
25	70.83 b	3.25 a	9.93 a	20.68 b	17.47 a
50	91.67 a	3.43 a	9.62 a	28.62 a	19.98 a
100	91.67 a	2.68 a	9.25 a	18.18 b	18.44 a
200	83.33 ab	3.00 a	11.12 a	23.56 ab	17.32 a
DMS (P ≤ 0.05)	14.77	0.76	2.01	5.73	4.78

En las columnas, letras iguales indican sin diferencia significativa (LSD, P ≤ 0.05);

DMS: Diferencia mínima significativa.

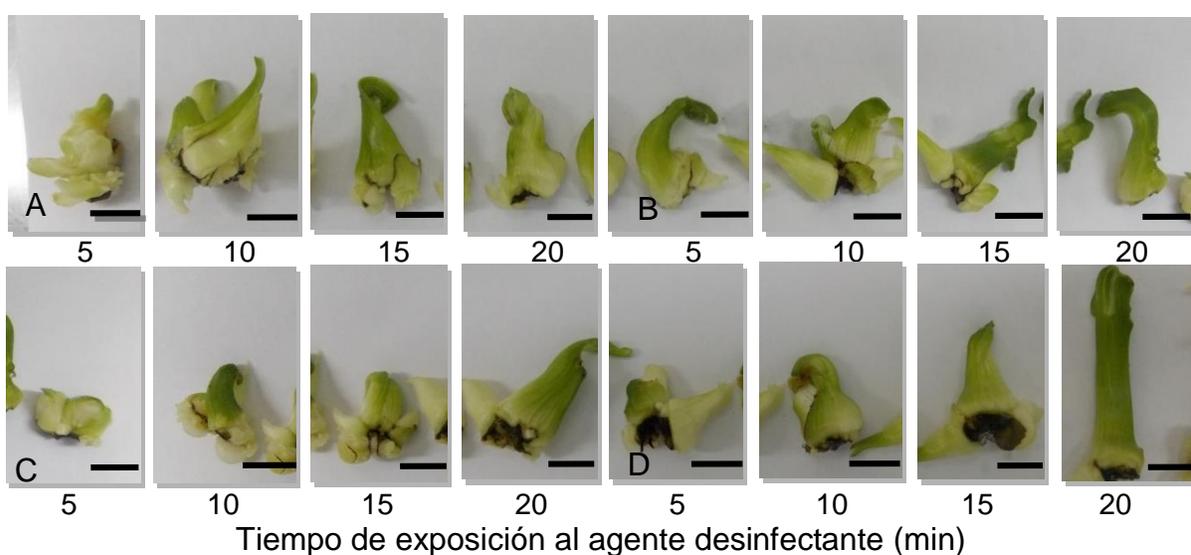


Figura 2.1. Efecto de la concentración de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de ápices de gladiolo, seis semanas después del establecimiento (barra = 1.0 cm). A: 25 mgL⁻¹, B: 50 mgL⁻¹, C: 100 mgL⁻¹, D: 200 mg L⁻¹.

de los explantes, a pesar de utilizar un tiempo de inmersión nueve veces mayor al usado en la presente investigación. Lo anterior indica que para la desinfectación de explantes de gladiolo podría usarse mayor tiempo de exposición a las NPsAg.

Cuadro 2.2. Efecto del tiempo de exposición de NPsAg como agente desinfectante en el establecimiento *in vitro* de gladiolo.

Tiempo de inmersión (min)	Asepsia (%)	Brotos por explante (Núm.)	Diámetro de brote (mm)	Longitud de brote (mm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
5	91.67 a	3.25 ab	9.56 ab	23.31 ab	19.47 a
10	79.17 a	3.25 ab	11.43 a	19.25 b	18.43 a
15	83.33 a	3.37 a	9.75 ab	26.56 a	18.93 a
20	83.33 a	2.50 b	9.18 b	21.93 ab	16.39 a
DMS (P ≤ 0.05)	14.77	0.76	2.01	5.73	4.78

En las columnas, letras iguales indican sin diferencia significativa (LSD, P ≤ 0.05); DMS: Diferencia mínima significativa.

El número de brotes fue similar al desinfectar por 5 o 10 minutos, pero al hacerlo por 15 minutos se obtuvo el mayor número de brotes; sin embargo, al aumentar a 20 minutos el tiempo de inmersión de los explantes, el número de brotes fue menor que con los otros tres tiempos de desinfección. La longitud del brote varió de 19.25 a 26.56 mm, el mayor valor correspondió a los brotes cuyos explantes fueron desinfectados por inmersión de NPsAg durante 15 min, el menor valor se obtuvo al desinfectar por 10 min. Considerando el número de brotes por explante y longitud del brote, el mejor tiempo de inmersión en NPsAg fue 15 min (Cuadro 2.2, Figura 2.1).

La interacción de la concentración de NPsAg y el tiempo de exposición mostró efecto altamente significativo solo para el contenido de clorofila (Figura 2.2), indicando que la concentración y el tiempo de exposición con mejor resultado fue 100 mg L⁻¹ con 10 min (32.40 unidades SPAD).

El uso de NPsAg parece más conveniente y menos tóxico que el uso de antibióticos en el medio de cultivo; las NPsAg pueden ser una herramienta eficaz para la eliminación de contaminantes de tejidos de la planta, utilizada en la concentración y tiempo de exposición adecuada (Mahna *et al.*, 2013). Fakhreshani *et al.* (2012) investigaron la actividad antifúngica y antibacteriana de las NPsAg en la micropropagación de gerbera

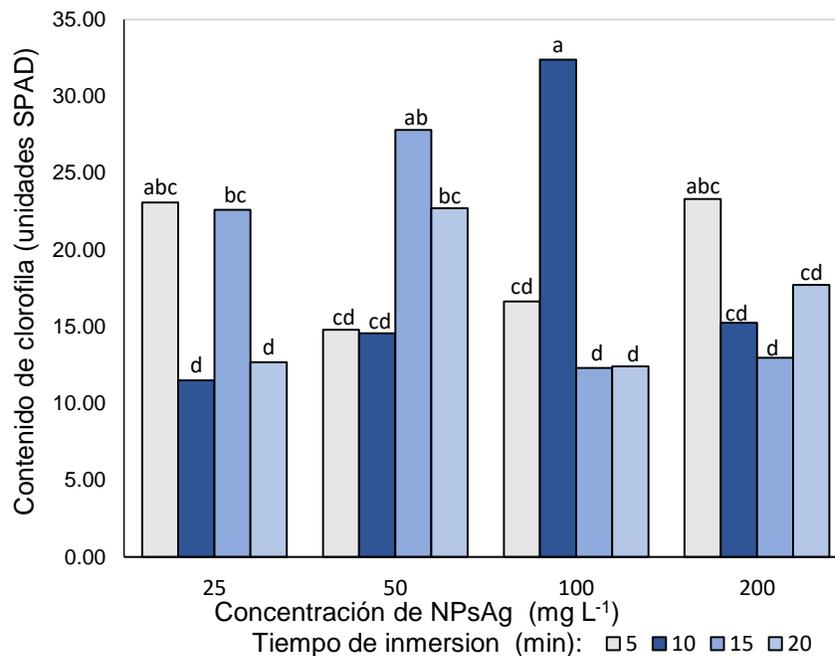


Figura 2.2. Efecto de la concentración de NPpAg en combinación con el tiempo de inmersión en el establecimiento *in vitro* de gladiolo (DMS = 9.57).

en cuatro concentraciones (25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹) y cuatro tiempos de exposición del explante (15, 30, 60 y 180 min) y reportaron que 200 mg L⁻¹ de NPpAg por 15 min de inmersión, controló exitosamente la contaminación bacteriana y fúngica, sin efectos negativos sobre la regeneración de plantas de gerbera. Por lo anterior, se puede decir que la concentración de NPpAg y el tiempo de inmersión variará en función de la especie, así como del tipo de explante desinfectado con este agente.

2.5.2. Nanopartículas de plata como agente antimicrobiano en el medio de cultivo

La concentración de NPpAg en el medio de cultivo tuvo efecto significativo en la longitud de los brotes y contenido de clorofila, mientras que el diámetro y número de brotes no fueron afectados (Cuadro 2.3). El efecto de las cuatro concentraciones de NPpAg (25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹) mostró 100 % de asepsia en el medio de cultivo, sin embargo, con la ausencia de NPpAg la contaminación microbiana fue del 80 %

Cuadro 2.3. Efecto de la concentración de NPsAg en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de gladiolo.

Concentración de NPsAg (mg L ⁻¹)	Asepsia (%)	Brotos por explante (Núm.)	Diámetro de brote (mm)	Longitud de brote (mm)	Contenido de clorofila (Unidades SPAD)
0	20	3.2 a	15.00 a	40.00 ab	16.0 b
25	100	3.6 a	12.80 a	50.00 ab	29.2 a
50	100	3.8 a	16.20 a	62.00 a	18.1 b
100	100	2.8 a	13.20 a	44.00 ab	11.0 b
200	100	2.4 a	13.80 a	26.00 b	15.2 b
DMS (P ≤ 0.05)		2.01	4.61	30.93	9.31

En las columnas, letras iguales indican sin diferencia significativa (LSD, P ≤ 0.05); DMS: Diferencia mínima significativa.

(Figura 2.3). Safavi (2012) al evaluar cinco concentraciones de NPsAg (5, 25, 50, 75 y 100 mg L⁻¹) como parte del medio MS, reportó buenos resultados con 100 mg L⁻¹ de NPsAg para eliminar contaminantes bacterianos en el medio, obteniendo buen desarrollo de explantes. Por su parte, Ouda (2014) demostró que las nanopartículas de plata son una gran promesa como agente antimicrobial para el control efectivo de fitopatógenos como la *Alternaria alaternata* y *Botrytis cinérea*. Sarmast *et al.* (2011) demostraron que en *Araucaria excelsa* R. Br. Var. *glauca* (Norfolk Island-pino) (*syn*: *A. heterophylla*) las NPsAg eliminaron con éxito la contaminación, adicionándolas al medio de cultivo, a diferencia de los descontaminantes convencionales. También Shokri *et al.* (2014) en un experimento con rosal, adicionaron NPsAg al medio de cultivo (0, 50, 100 y 150 mg L⁻¹) y en otro experimento los explantes se sumergieron por 20 min en diferentes soluciones de NPsAg (0, 100, 200 y 400 mg L⁻¹), observaron que la concentración de 100 mg L⁻¹ adicionada directamente al medio puede reducir la contaminación bacteriana y la tasa de exudación fenólica y que la desinfección con 200 mg L⁻¹ por 20 min de inmersión fue el mejor tratamiento para controlar la incidencia de bacterias.

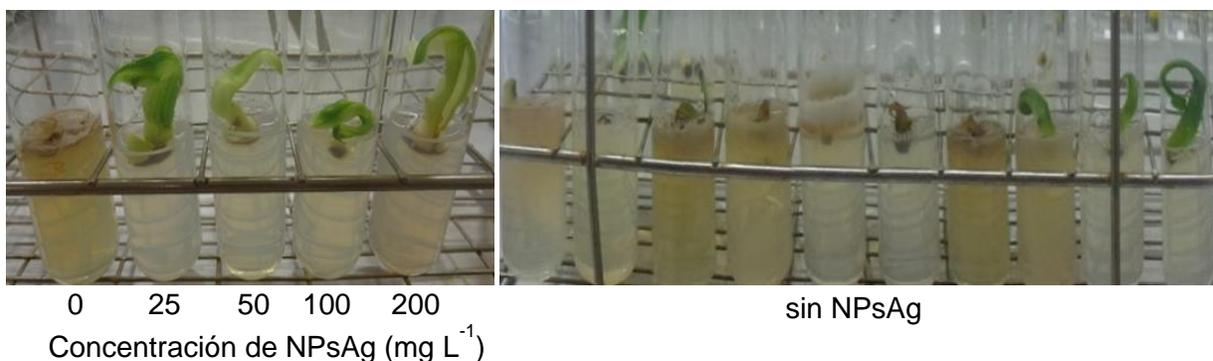


Figura 2.3. Efecto de la concentración de NPsAg en el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de gladiolo.

El uso de nanopartículas de plata como parte del medio de cultivo, para evitar el crecimiento de agentes microbianos, contribuirá al ahorro de la energía eléctrica que normalmente se requiere para esterilizar los medios de cultivo a usar en la micropropagación de plantas y en particular de producción de microcormos de gladiolo.

La longitud del brote fue mayor conforme se incrementó la cantidad de NPsAg en el medio de cultivo hasta 50 mg L⁻¹, cuando la concentración fue mayor, los brotes fueron más pequeños, con ésta concentración se tuvieron brotes 35.5 % más altos en comparación con el control sin NPsAg (Cuadro 2.3); sin embargo, el contenido de clorofila de los brotes fue mayor con 25 mg L⁻¹ de NPsAg, 45 % más clorofila que cuando no se usaron NPsAg. En general, considerando 4 de 5 variables, la mejor concentración de NPsAg para desinfectar el medio de cultivo y para el crecimiento de los explantes fue 50 mg L⁻¹.

Al igual que en esta investigación, Aghdaei *et al.* (2012) evaluaron el efecto de las NPsAg en la micropropagación de *Tecomella undulata* (Roxb) e indicaron que la adición de NPsAg al medio MS aumentó el número de brotes por explante, el porcentaje de explantes que producen brotes y también la supervivencia de la planta, debido a su acción sobre el bloqueo de etileno. Sarmast y Salehi (2016) sugieren que la principal ventaja del uso de NPsAg en la horticultura se centra en las propiedades antimicrobianas y nutritivas y en la mejora del crecimiento de las plantas en la concentración permisible.

2.6. CONCLUSIONES

El uso de nanopartículas de plata como auxiliar en la desinfección de explantes, resultó ser una herramienta eficaz en el control de la contaminación microbiana. Los resultados de esta investigación indican que la desinfección de los ápices de gladiolo var. 'Ámsterdam' con 50 mgL⁻¹ de NPsAg por 15 min de inmersión fue adecuada para la asepsia y crecimiento de explantes; la desinfección del medio de cultivo con 50 mgL⁻¹ de nanopartículas de plata es una alternativa para desinfectar el medio de cultivo sin esterilizar en autoclave, obteniendo además respuesta favorable en el crecimiento de los explantes.

2.7. LITERATURA CITADA

- Abdi, G., H. Salehi and M. Kush-Khui (2008) Nano Silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) Tissue Culture. *Acta Physiology Plantarum* 30:709-714.
- Aghdaei, M., H. Salehi and M.K. Sarmast (2012) Effect of silver nanoparticles on *Tecomella undulata* (Roxb) Seem. micropropagation. *Advances in Horticultural Science* 26:21-24.
- Al-Ani, N.K. (2011) Using silver nano-particles to increase efficiency of sterile solution for *in vitro* techniques. *Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics* 4:48-51.
- Arab, M. M., A. Yadollahi, M. Hosseini-Mazinani and S. Bagheri (2014) Effects of antimicrobial activity of silver nanoparticles on *in vitro* establishment of G x N15 (hybrid of almond x peach) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 12:103-110.
- Bernard, F., N. N. Moghadam and F. Mirzajani (2015) The effect of colloidal silver nanoparticles on the level of lignification and hyperhydricity syndrome in *Thymus daenensis* vitro shoots: a possible involvement of bonded polyamines. *Plant Tissue Culture In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 51:546-553.

- COLPOS-Cordoba (2014) Ficha técnica AgROVIT-CP. Colegio de postgraduados campus Córdoba. México.
- Durán, N., P. D. Marcato, R. De Conti, O.L. Alves, F. T. M. Costa and M. Brocchi (2010) Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of Brazilian Chemical Society* 21:949-959.
- Fakhrfeshani, M., A. Bagheri and A. Sharifi (2012) Disinfecting effects of nano silver fluids in gerbera (*Gerbera jamesonii*) capitulum Tissue Culture. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 6:121-127.
- Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp and L. Mroginski (2010) Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Ediciones INTA. Argentina. 648 p.
- Mahna N., S.Z. Vahed and S. Khani (2013) Plant *in vitro* culture goes nano: nanosilver-mediated decontamination of *ex vitro* explants. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology* 4:161.
- Memon, N., A. Yasmin, V. M. Pahoja, Z. Hussain and I. Ahmad (2012) *In vitro* regeneration of gladiolus propagules. *Journal of Agricultural Technology* 8: 2331-2351.
- Monge, M. (2009) Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericida. *Investigación Química* 105:33-41.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Pal, S., Y. K. Tak and J. M Song (2007) Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 73:1712-1720.
- Pérez-Uz, Silóniz, Torralba, Vázquez (2010) Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca (biología), Serie Microbiología*. 3:1-14.

- Ouda, S.M. (2014) Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology* 9:34-42.
- Rai, M., A. Yadav and A. Gade (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27:76-83.
- Rosttami, A. A. and A. Shahsavari (2009) Nano-silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive "Mission" explants. *Asian Journal of Plant Sciences* 8:505-509.
- Safavi, K. (2012) Evaluation of using nanomaterial in tissue culture media and biological activity. 2nd International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (EEBS'2012) oct. 13-14, 2012 Bali (Indonesia).
- Sarmast, M. K., H. Salehi and M. Khosh-Khui (2011) Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. BR. Var. *Glauca* explants. *Acta Biologica Hungarica* 62:477-484.
- Sarmast, M. K. and H. Salehi (2016) Silver nanoparticles: An influential element in plant nanobiotechnology. *Molecular Biotechnology*. Springer Science and Business Media New York. Pp. 1-9 DOI 10.1007/s12033-016-9943-0
- Shokri, S., A. R. Babaei, M. Ahmadian, S. Hessami and M. M. Arab (2014) The effects of different concentrations of Nano-Silver on elimination of Bacterial contaminations and phenolic exudation of Rose (*Rosa hybrida* L.) *in vitro* culture. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 3:50-54.
- Statistical Analysis Software (SAS) (2002) Statistical analysis system Institute Inc. Cary, NC, USA. Proprietary Software Version 9.00 (TS M0).
- Taghizadeh, M. and M. Solgi (2014) The application of essential oils and silver nanoparticles for sterilization of bermuda grass explants in *in vitro* culture. *International Journal of Horticultural Science and Technology* 1:131-140.

3. CAPÍTULO 2. EVALUACIÓN DE TRES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA MULTIPLICACIÓN DE MICROCORMOS DE GLADIOLO

José Antonio Chávez-García¹, María Andrade-Rodríguez^{1*}, Porfirio Juárez-López¹, Oscar Gabriel Villegas-Torres¹, Héctor Sotelo-Nava¹, Francisco Perdomo-Roldan²

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, ²Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

*Autor para correspondencia (maria.andrade@uaem.mx)

3.1. RESUMEN

En la industria ornamental, el gladiolo (*Gladiolus* sp.) se encuentra dentro de las principales flores de corte a nivel mundial. La propagación es a través de cormos, con tasas de multiplicación bajas, lo que hace necesario el uso de técnicas de cultivo *in vitro* para obtener material vegetativo con características morfológicas idénticas, uniformes y libres de enfermedades. Sin embargo, la investigación en multiplicación *in vitro* de gladiolo es escasa. El sistema de inmersión temporal (RITA) se usó con éxito para producir microcormos de gladiolo *in vitro*. A la fecha, el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT) no se ha usado para producción de microcormos de gladiolo *in vitro*, el cual implica sólo 25 % del costo de un sistema RITA. El objetivo fue evaluar tres sistemas de cultivo *in vitro*: medio semisólido, medio líquido en inmersión parcial y medio líquido en biorreactores de inmersión temporal (BIT), para la multiplicación de microcormos de gladiolo. En el sistema BIT hubo un incremento de 91 % en la multiplicación de microcormos en comparación con el sistema semisólido y de 100 % en relación con el sistema de inmersión parcial. También el número de brotes fue mayor (41.3) en el sistema BIT que en el sistema de cultivo en medio semisólido y en el sistema de cultivo en medio líquido con inmersión parcial (5.8 y 6.5 brotes por explante). Estos resultados permitieron establecer el

uso de biorreactores de inmersión temporal como mejor sistema para la multiplicación masiva de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.

Palabras clave: *Gladiolus* sp., cultivo de tejidos vegetales, Sistemas de Inmersión Temporal, microcormos.

3.2. SUMMARY

In the ornamental industry, gladiolus (*Gladiolus* sp.) is one of the main cut flowers worldwide. The propagation is through corms, with low multiplication rates, which makes it necessary to use *in vitro* techniques to obtain vegetative material with identical, uniform and disease-free physiological characteristics. However, the research about *in vitro* multiplication of gladiolus is scarce. The temporary immersion system (RITA) was used successfully to produce gladiolus microcorms *in vitro*. To date, the temporary immersion bioreactor system (BIT) has not been used for production of *in vitro* gladiolus microcorms, which represents only 25 % of the cost of a RITA system. The objective was to evaluate three *in vitro* culture systems: semi-solid medium, liquid medium in partial immersion and liquid medium in temporary immersion bioreactors (BIT), for the multiplication of gladiolus microcorms of the variety 'Ámsterdam'. In the BIT system there was an increase of 91 % in microcorms multiplication compared to the semisolid system and 100 % in relation to the partial immersion system. The number of shoots was also higher (41.3) in the BIT system than in the semi-solid culture system and in the liquid culture system with partial immersion (5.8 and 6.5 shoots per explant). These results allowed the use of temporary immersion bioreactors to be established as the best system for the massive multiplication of gladiolus microcorms var. 'Ámsterdam'.

Index words: *Gladiolus* sp., plant tissue culture, Temporary Immersion Systems, microcorms.

3.3. INTRODUCCIÓN

El gladiolo ocupa el octavo lugar a nivel mundial como cultivo para flor de corte, en tanto que en México ocupa el primer lugar de producción con 4 605.8 hectáreas; los estados productores son Estado de México, Puebla, Morelos, Michoacán, Guerrero, Veracruz y Oaxaca (SIAP, 2017). Su reproducción se basa en la multiplicación natural de cormos y microcormos. La tasa de multiplicación es lenta (se requieren dos ciclos de cultivo en campo) e insuficiente para abastecer la demanda comercial (Memon *et al.*, 2016). El uso de la biotecnología vegetal con técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es aplicable en la industria ornamental, ideal para la multiplicación de materiales con potencial comercial (García-González *et al.*, 2010), al obtener material vegetativo con características genéticas idénticas, uniformes y libres de enfermedades (Torabi-Giclou y Hajieghrari, 2008). La aplicación comercial de la propagación *in vitro* con medio de cultivo semisólido puede ser limitada por la cantidad de material vegetal que se necesita para poner en marcha nuevas unidades de producción, por los altos costos de producción y por el tiempo requerido para la reproducción, debido a tasas de multiplicación bajas y pérdida de material por problemas de contaminación (Lyam *et al.*, 2012); otra limitante es la escasez de automatización para la propagación masiva comercial (Berthouly y Etienne, 2005; Ruffoni y Savona, 2005; Mehrotra *et al.*, 2007). Lo anterior limita la producción comercial de microcormos de gladiolo en México.

El uso de medio de cultivo líquido en lugar de los medios semisólidos tiene beneficios en la tasa de crecimiento y multiplicación de los tejidos (Ascough y Fennell, 2004; Preil, 2005), reduce el trabajo del personal, facilita el contacto del explante con el medio de cultivo, permite la absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento, además del escalamiento a través de la automatización de los procesos (Berthouly y Etienne, 2005; Mehrotra *et al.*, 2007; Businge *et al.*, 2017). Sin embargo, la exposición continua del material de propagación al medio líquido aumenta el riesgo de asfixia e hiperhidricidad (Berthouly y Etienne, 2005; Ruffoni *et al.*, 2011; Lyam *et al.*, 2012).

El sistema de inmersión temporal (SIT), al combinar los beneficios de la aireación del medio sólido y el contacto completo con medio líquido, ofrece una alternativa viable en la

multiplicación *in vitro* (Escalona *et al.*, 1999; Businge *et al.*, 2017), ya que proporciona un entorno más natural para el cultivo *in vitro* de plantas. Los brotes cultivados se sumergen periódicamente en un medio líquido y luego se exponen a un entorno gaseoso, a través de un sistema semiautomático o totalmente automatizado (García-González *et al.*, 2010; Georgiev *et al.*, 2014); como resultado se reducen los costos asociados con el manejo y la cosecha, facilitan la renovación del medio de cultivo, se reduce el área de estantería y la contaminación, mejoran la supervivencia en la aclimatación, e incrementan la eficiencia y la calidad de las plantas (Mehrotra *et al.*, 2007; Lyam *et al.*, 2012).

En gladiolo se ha estudiado la multiplicación *in vitro* en diferentes sistemas y condiciones (Prasad y Gupta, 2006; Ruffoni *et al.*, 2011). Sin embargo, la investigación en multiplicación de microcormos *in vitro* es escasa (Memon *et al.*, 2016). El sistema de inmersión temporal (RITA) se usó con éxito para producir microcormos, con diferente tasa de multiplicación por efecto del genotipo (Ruffoni *et al.*, 2012). A la fecha, el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT) (Escalona *et al.*, 1999) no se ha usado para producción de microcormos de gladiolo *in vitro*, el cual implica sólo 25 % del costo de un sistema RITA. Por otro lado, la producción *in vitro* de microcormos de gladiolo es afectada significativamente por el genotipo (Ruffoni *et al.*, 2011), por lo que es necesario determinar la respuesta de cada genotipo en particular. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar tres sistemas de cultivo *in vitro*: medio semisólido, medio líquido en inmersión parcial y biorreactor de inmersión temporal, para la multiplicación de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo Tecnológico de FIRA (Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura), Tezoyuca, Morelos, México. Los explantes fueron tomados de cormos de gladiolo, var. 'Ámsterdam' plantados en macetas 15.24 cm con tepojal, con una granulometría de 5 mm, regados diariamente durante 25

días. El ápice del brote (7 mm de ancho y 15 mm de alto) fue aislado de cormos previamente lavados.

Desinfección de explantes. Con base en ensayos preliminares se determinó la metodología de desinfección, los explantes se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex[®]) al 3 % v/v más 0.5 g L⁻¹ de detergente roma en agua desmineralizada y se mantuvieron en agitación constante por cinco min. Posteriormente, en condiciones de asepsia, los ápices fueron colocados durante 18 minutos en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex[®]) al 10 % v/v con agua destilada estéril; posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Establecimiento *in vitro*. Con base en ensayos preliminares se determinó el medio de cultivo y suplementos orgánicos a usar. Después de la desinfección, los ápices se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico (1 mg L⁻¹), 120 mg L⁻¹ de inositol, 2 mg L⁻¹ de 6-Benciladenina, 30 g de sacarosa, 6.5 g L⁻¹ de agar (Merck[®]), con un pH ajustado a 5.7 (pH metro Hanna[®]). El medio se esterilizó durante 18 min en autoclave (Equipos médicos especiales ARA[®]) a 1.2 kg cm⁻² y 120 °C. En cada tubo de cultivo que contenía 10 mL de medio se estableció un ápice. Los cultivos se incubaron a 24 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h luz (1800 lux) y 8 horas de oscuridad. Después de dos periodos de cultivo de 30 días cada uno, en el mismo medio de cultivo, se obtuvo cada propágulo (grupos de brotes menores de 10 mm de longitud).

Sistemas de cultivo *in vitro*. Para evaluar los tres sistemas de cultivo *in vitro* se usaron grupos de brotes (menores de 10 mm de longitud) obtenidos del establecimiento descrito anteriormente. El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico (1 mg L⁻¹), 120 mg L⁻¹ de inositol, 1.0 mg L⁻¹ de ácido 3-Indolbutírico (AIB), 0.6 mg L⁻¹ de 2-isopentil adenina (2iP) (Ruffoni *et al.*, 2012), 80 g de sacarosa y pH de 5.7. El medio se esterilizó en autoclave a 1.2 kg cm⁻² y 120 °C durante 18 min. Para todos los tratamientos se utilizaron frascos de vidrio tipo conserveros de 980 mL.

Los brotes se cultivaron en tres sistemas: medio semisólido con 6.5 g L⁻¹ de agar, inmersión parcial de acuerdo a Escalona *et al.* (1999) (5 mm de la base del brote se sumergió en medio

líquido), e inmersión temporal utilizando el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®) (Escalona *et al.*, 1999). En estos se utilizaron 60, 30 y 250 mL de medio de cultivo, respectivamente. En cada sistema se utilizaron cinco brotes por frasco. En el caso del BIT se usaron 3 min de inmersión con una frecuencia de 4 h. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento.

Al igual que el establecimiento *in vitro*, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 24 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz (1800 lux) y 8 horas de oscuridad, usando lámparas de luz blanca.

La evaluación de los tres sistemas de cultivo se hizo después de 110 días de incubación (sin subcultivos). Las variables evaluadas fueron número de brotes por explante, longitud (mm) de brote, número de raíces, longitud (mm) de raíz y número, diámetro y biomasa de microcormos. Las variables de longitud y diámetro se midieron con vernier digital marca Truper®.

Análisis de datos. Los datos de cada variable se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias (LSD, $P \leq 0.05$), mediante el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza en las siete variables evaluadas indicaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) entre los sistemas de cultivo *in vitro* (análisis no mostrado en cuadro).

Los resultados en cada sistema se muestran en el Cuadro 3.1. El sistema de inmersión temporal BIT claramente generó 80 % más brotes que los otros dos sistemas. El sistema con medio semisólido produjo una cantidad de brotes similar al sistema de inmersión parcial. De igual modo, la longitud de brotes fue mayor en el sistema BIT, cuya diferencia

Cuadro 3.1. Características de brotes y microcormos de gladiolo variedad *Ámsterdam* en tres sistemas de cultivo *in vitro*.

Sistema de cultivo	Brotes (Núm.)	Longitud de brote (mm)	Raíces (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Mcormo (Núm.)	Diámetro de Mcormo (mm)	Biomasa de Mcormo (g)
MSS	5.75 b	204.2 b	6.75 b	74.95 a	3.00 b	6.20 a	0.252 a
MLIP	6.50 b	80.0 b	0.00 c	0.00 c	0.00 b	0.00 b	0.000 c
BIT	41.25 a	252.5 a	29.50 a	40.00 b	34.75 a	6.57 a	0.352 a
DMS	11.40	45.83	7.61	7.37	9.18	1.38	0.116

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$), DMS: Diferencia mínima significativa. MSS: medio semisólido, MLIP: medio líquido en inmersión parcial, BIT: medio líquido en biorreactores de inmersión temporal, Mcormo: microcormo

fue mayor de 19 % con relación al sistema semisólido y 68 % con respecto al sistema de inmersión parcial, lo que indica mayor producción de biomasa en los cultivos de sistema BIT. Los brotes con menor longitud fueron los obtenidos en el sistema de inmersión parcial.

Aunque se reporta que los medios líquidos pueden aumentar la tasa de proliferación de brotes, además de permitir la automatización (Prasad y Gupta, 2006), en esta investigación se observó que el uso de medio líquido con inmersión parcial generó resultados similares a los obtenidos con medio semisólido.

En la comparación de los sistemas de cultivo sólidos y líquidos, los sistemas biorreactores de inmersión temporal (BIT) han demostrado ofrecer beneficios tecnológicos y cuantitativos, como mayor tasa de proliferación, tal como ocurrió en esta investigación y como se reporta para cultivares de *Eucalyptus Birch* y *Fir* (Businge *et al.*, 2017). Esto coincide también con lo reportado por Escalona *et al.* (1999) para piña (*Ananas comosus* L.), en donde se observó que los explantes cultivados en el sistema de inmersión temporal tuvieron la mayor tasa de multiplicación, misma que aumentó en 3.5 y 4.8 respecto a la obtenida en medio líquido y sistemas convencionales de soporte sólido, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en *Paeonias* sp. (Lezcano *et al.*, 2010).

Además de producción de brotes se logró la formación y crecimiento de raíces. Ésta se vio favorecida en el sistema BIT pues se tuvieron cuatro veces más raíces que en el sistema semisólido, caso contrario ocurrió en el sistema de inmersión parcial en donde no hubo formación de raíces (Cuadro 3.1). La longitud de raíces fue inversamente proporcional al número de éstas, ya que las raíces más largas fueron las del menor número de brotes obtenidos en el sistema con medio semisólido.

Con respecto al número de microcormos, el sistema BIT incrementó la producción en 11.6 veces en comparación con el sistema de cultivo en medio semisólido y 34.8 veces más que en el sistema de inmersión parcial, en el cual no se formaron microcormos (Cuadro 3.1, Figura 3.1). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ruffoni *et al.* (2012) quienes evaluaron la proliferación y el diámetro de microcormos de gladiolo después 90 días de cultivo. Los mismos autores señalan que las plantas crecieron más rápido en el sistema de inmersión temporal RITA[®] que en medio sólido; además mencionan que no fue necesario hacer subcultivos del material, lo cual permitió cosechar los microcormos de gladiolo directamente del biorreactor. También hay similitud con lo observado en la producción de microtubérculos de papa, en la cual se tuvo mayor cantidad de tubérculos al usar la inmersión temporal que cuando se usó medio semisólido (Jiménez *et al.*, 1999).

El diámetro de los microcormos (Cuadro 3.1) fue similar en el sistema de cultivo en medio semisólido y en el sistema BIT, en los cuales se tuvo un diámetro de 6.4 mm; de igual manera, la biomasa de los microcormos obtenidos en ambos sistemas de cultivo fue similar. Con relación al tamaño de las estructuras de multiplicación, Lezcano *et al.* (2010) observaron mayor tamaño de brote principal en *Paeonias* sp. al usar el sistema de inmersión temporal que en medio semisólido y en medio líquido estático. Los resultados de la presente investigación contradicen lo reportado por Jiménez *et al.* (1999), quienes indican que el sistema de inmersión temporal aumentó el tamaño y biomasa de tubérculos de papa.

El mejor sistema para la multiplicación de brotes y microcormos de gladiolo *in vitro* fue el sistema de biorreactor de inmersión temporal (BIT) (Cuadro 3.1). Lo anterior se



Figura 3.1. Efecto de tres sistemas de cultivo *in vitro*, en gladiolo var. Ámsterdam. A: Semisólido, B: Inmersión parcial, C: Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), D: Microcormos obtenidos en BIT.

explica porque en este sistema, de manera periódica los explantes tuvieron contacto con los componentes del medio de cultivo por todos lados durante 3 min, facilitando la absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento (Berthouly y Etienne, 2005; Mehrotra *et al.*, 2007; Businge *et al.*, 2017); además, este sistema permite que el medio de cultivo y los explantes reciban oxigenación de manera periódica (Escalona *et al.*, 1999; Businge *et al.*, 2017). Ambas situaciones repercutieron en mayor tasa de multiplicación de brotes y microcormos. Los resultados obtenidos en esta investigación serán de utilidad para la propagación masiva de gladiolo con material de calidad física y sanitaria, para solucionar la demanda de cormos comerciales en la producción de flor de corte.

3.6. CONCLUSIÓN

La mayor eficiencia de multiplicación de brotes y microcormos de gladiolo se logró en el cultivo en medio líquido en biorreactores de inmersión temporal (BIT), donde además se pueden recolectar con facilidad.

3.7. LITERATURA CITADA

Ascough G. D. and C. W. Fennell (2004) The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany* 70:181-190.

Berthouly M. and H. Etienne (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. *In: A. K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.). Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Springer.*165-203.

Businge E., A. Trifonova, C. Schneider, P. Rödel and U. Egertsdotter (2017) Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of eucalyptus, birch and fir. *Forests* 8: 196.

Escalona M., J. C. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, J. L. González D. and C. G. Borroto (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18:743-748.

García-González R., K. Quiroz, B. Carrasco and P. Caligari (2010) Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria* 37:5-30.

Georgiev V., A. Schumann, A. Pavlov and T. Bley (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14:607-621.

- Jiménez E., N. Pérez, M. de Feria, R. Barbón, A. Capote, M. Chávez and E. Quiala (1999) Improved production of potato microtubers in a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59:19-23.
- Lezcano Y., M. Escalona, M. Daquinta (2010) Multiplicación *in vitro* de *Paeonias* sp. variedad 'SeSu' en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal* 10:169-175.
- Lyam P. T., M. L. Musa, Z. O. Jamaledine and U. A. Okere (2012) The potential of temporary immersion bioreactors (TIBs) in meeting crop production demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Science* 3:66-86.
- Mehrotra S., M. K. Goel, A. K. Kukreja and B. N. Mishra (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 6:1484-1492.
- Memon N. U. N., N. A. Wahocho, T. F. Miano and M. H. Leghari (2016) Propagation of *Gladiolus* corms and cormels: A review. *African Journal of Biotechnology* 15:1699-1710.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Prasad V. S. S. and S. D. Gupta (2006) In vitro shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid cultures with support systems. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 87:263-271.
- Preil W. (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: A. K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer. 1-18.
- Ruffoni B. and M. Savona (2005) The Temporary Immersion System (T.I.S.) for the Improvement of Micropropagation of Ornamental Plants. *Acta Horticulturae* 683:445-449.

- Ruffoni B., M. Pamato and M. Brea (2011) Improvement of the propagation of *Gladiolus* hybrids selected for extra-season mediterranean production. *Acta Horticulturae* 886:219-224.
- Ruffoni B., M. Savona and S. Barberini (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, NC, USA. 4424 p.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2017) Estadística de la Producción Agrícola de 2017. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>.
- Torabi-Giglou M. and B. Hajieghrari (2008) *In vitro* study on regeneration of *Gladiolus grandiflorus* corm calli as affected by plant growth regulators. *Pakistan Journal Biological Sciences* 11:1147-1151.

4. CAPITULO 3. FRECUENCIA DE INMERSIÓN Y VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO PARA LA FORMACIÓN DE MICROCORMOS DE GLADIOLO EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL BIT

José Antonio Chávez-García¹, María Andrade-Rodríguez^{1*}, Jericó Jabín Bello-Bello², Manuel de Jesus Sainz-Aispuro¹, Dagoberto Guillén-Sánchez¹

¹Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

²Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Campus Córdoba, Km 348 carretera federal Córdoba-Veracruz, Congregación Manuel León. C.P. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México.

Autor para correspondencia (maria.andrade@uaem.mx)

4.1. RESUMEN

La gladiola está considerada como una de las flores de corte más comerciales por su gran diversidad de tamaños, colores, forma de las flores, épocas de floración y vida en florero, la calidad de esta flor depende en gran medida del cormo que se usa como estructura de reproducción vegetativa, la producción *in vitro* es una alternativa eficiente en la industria de este cultivo. El sistema de inmersión temporal ha demostrado ser una herramienta complementaria para la micropropagación de diferentes especies; sin embargo, para cada especie, incluso para cada cultivar y etapa de desarrollo, además de utilizar el SIT apropiado, es necesario definir los parámetros de operación para obtener el mayor potencial de escalamiento y automatización del sistema convencional de micropropagación. Con el propósito de desarrollar un protocolo para la reproducción masiva de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' en biorreactor de inmersión temporal (BIT®), 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 usó 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 biomasa de microcormos. Los resultados mostraron que con la frecuencia de inmersión cada 4 horas y con 55.6 mL de medio cultivo por propágulo se obtuvieron 34.8 microcormos por explante como mejor resultado, por lo que estos parámetros de operación, pueden ser usados para el escalamiento a producción comercial de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.

Palabras clave: Sistema de Inmersión Temporal, Micropropagación masiva

4.2. SUMMARY

Gladiolus is considered one of the most commercial cut flowers for its great diversity of sizes, colors, flower shape, flowering times and vase life, the quality of this flower depends largely on the corm used as vegetative reproduction structure, *in vitro* production is an efficient alternative in the industry of this crop. The temporary immersion system has proven to be a complementary tool for the micropropagation of different species; however, for each species, even for each cultivar and stage of development, in addition to using the appropriate SIT, the operating parameters are essential to obtain the greatest potential for scaling and automation of the conventional micropropagation system. With the purpose of developing a protocol for the massive reproduction of microcorms of gladiolus variety 'Amsterdam' in a temporary immersion bioreactor (BIT®). The effect of different immersion frequencies (4, 8 and 12 h) and six variants of the culture medium volume (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 with four repetitions per treatment was used. After 110 days of incubation; the number of shoots per propagule, bud length, root number, root length, number, diameter and biomass of microcorms were counted. The results showed that with the immersion frequency every 4 hours and with 55.6 mL of culture medium per propagule, 34.8 microcorms per explant were obtained as the best result, so these operating

parameters can be used for scaling to commercial production of microcorms gladiolus var. 'Amsterdam'.

Index words: Temporary Immersion System, Mass micropropagation

4.3. 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, los altos niveles de trabajo manual y bajo grado de automatización son la causa de que a la fecha no se haya 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 permitiendo la automatización de los sistemas de cultivo *in vitro* (Aguirre *et al.*, 2016; Mendonça *et al.*, 2016; Businge *et al.*, 2017), 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 (Albarrán *et al.*, 2004; Albany *et al.*, 2015; Alvarenga y Salazar, 2015).

El ambiente en el interior de los recipientes de cultivo presenta variaciones de temperatura, elevada humedad relativa y grandes cambios diarios en la concentración de CO₂, mismas que pueden ser afectadas por el tipo de recipiente de cultivo (tamaño, forma, material y sistema de cierre) que puede condicionar la evolución de la composición gaseosa en su interior 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 lograr 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 en el medio de 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 (Etienne y Berthouly, 2002; Escalona *et al.*, 2007; De Feria *et al.*, 2003). El volumen de medio de cultivo 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 var. 'Ámsterdam'.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

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

4.4.1. Sistema de Inmersión Temporal (BIT)

De acuerdo a lo propuesto por Escalona *et al.* (1999), el BIT estuvo compuesto por dos frascos de vidrio tipo conservero 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 μm , MIDISART 2000, de la compañía SARTORIUS para garantizar la esterilidad del aire. El aire a presión se inyectó con un compresor regulado por un manómetro.

4.4.2. 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 de gladiolo var. 'Ámsterdam', y se mantuvieron 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 dos experimentos que se describen a continuación.

4.4.3. Frecuencia de inmersión

El medio de cultivo utilizado fue Murashige y Skoog (1962) suplementado con tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico (1 mg L^{-1}), 120 mg L^{-1} de Inositol, 1.0 mg L^{-1} de ácido 3-indolbutírico (AIB), 0.6 mgL^{-1} 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^{-2} , $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 min.

El establecimiento en los frascos BIT se realizó en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar y consistió en colocar 5 explantes por frasco, previamente cultivados *in vitro* en medio semisólido (racimos de brotes menores a 10 mm de altura), posteriormente se colocaron 250 mL de medio de cultivo esterilizado en el frasco reservorio de medio. Los recipientes de cultivo con los explantes fueron incubados durante 110 días a $24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, un fotoperíodo de 16 h luz y ocho h de oscuridad, la intensidad luminosa fue de $32 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Diseño experimental

Se evaluaron tres frecuencias de inmersión, 4, 8 y 12 h, con 3 min cada una. 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, se registró el número, diámetro y biomasa de microcormos. Las variables de longitud y diámetro se midieron con vernier digital marca Truper®.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias (LSD, $P \leq 0.05$); se usó del paquete estadístico SAS 9.0 (SAS, 2002).

4.4.4. 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 (MS, 1962) suplementado con tiamina, piridoxina, glicina, ácido nicotínico (1 mg L^{-1}), 120 mg L^{-1} de Inositol, 1.0 mg L^{-1} de ácido 3-indolbutírico (AIB), 0.6 mg L^{-1} de 2- isopentiladenina (2 Ip) 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 kg cm^{-2} , $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 min.

Los explantes se cultivaron en inmersión temporal utilizando el BIT para lo cual, se colocaron 18, 15, 12, 9, 6, 3 explantes (racimos de brotes menores a 10 mm de altura) por frasco de cultivo, lo que dio lugar a utilizar 27.7, 33.3, 41.6, 55.5, 83.3, 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 y ocho horas de oscuridad, usando lámparas de luz blanca con intensidad luminosa de $32 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

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 de 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 longitud de raíz, también se evaluó el número, diámetro y biomasa de microcormos. Las variables de longitud y diámetro se midieron con vernier digital marca Truper®.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se estudiaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparación de medias (LSD, $P \leq 0.05$); se usó del paquete estadístico SAS 9.0 (SAS, 2002).

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. 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 biomasa de microcormo no fueron afectados por la frecuencia de inmersión (Cuadro 4.1). Al respecto, Rosales *et al.* (2018), menciona que el tiempo y frecuencia de inmersión son dos factores fundamentales para lograr mayor tasa de multiplicación y la mejor calidad de plantas.

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 frecuencia de inmersión y número de brotes por explante, por lo que la mejor frecuencia de inmersión fue de 4 h (41.25 brotes por explante) en comparación a los brotes obtenidos con 8 y 12 h (Figura 4.1), lo que representa diferencias de 30 y 60 % más brotes respectivamente (Cuadro 4.2). 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.

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 en comparación a 8 y 12 h, lo que

Cuadro 4.1. Análisis de varianza (cuadrados medios) de las características de brote, y microcormo de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto de la frecuencia de inmersión en el medio de cultivo.

F.V.	GL	Brotos por explante (Núm.)	Longitud de brotes (mm)	Raíces por explante (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Mcormos (Núm.)	Diámetro de Mcormo (mm.)	Biomasa de Mcormo (mm)
TRAT	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 ²		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, GL= Grados de libertad; TRAT = Tratamientos, R²: Coeficiente de determinación, C.V.= Coeficiente de variación, Mcormos: microcormos.



Figura 4.1. Efecto de frecuencias de inmersión (3 minutos de inmersión cada 4, 8 y 12 horas), en el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT), en gladiolo var. 'Ámsterdam'.

Implicó 7 y 24 % menor cantidad de raíces por explante respectivamente. Se obtuvo mayor cantidad de microcormos 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 (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Características de brotes y microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto de tres frecuencias de inmersión en el medio de cultivo.

Frecuencia de inmersión (h)	Brotos por explante (Núm.)	Longitud de brotes (mm)	Raíces por explante (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Mcormos (Núm.)	Diámetro de Mcormo (mm)	Biomasa de Mcormo (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	22.30 ab	42.00 a	17.50 b	5.77 a	0.33 b
12	14.50 b	248.18 b	15.50 b	45.30 a	8.50 b	6.77 a	0.44 a
DMS ($P \leq 0.05$)	11.00	68.68	9.87	15.23	9.27	1.11	0.09

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$)

DMS: Diferencia mínima significativa. Mcormo: microcormo.

La frecuencia más corta de inmersión tuvo efecto favorable para el crecimiento de los microcormos, ya que éstos tuvieron 440 mg de biomasa, 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.

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 utilizando el sistema RITA[®], usaron 3 min de inmersión cada 3 horas. De acuerdo al genotipo, obtuvieron de 4.2 a 18 brotes por explante, de 2.3 a 18 microcormos por explante con un diámetro de microcormo de 5.56 hasta 7.77 mm con biomasa 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 fueron superiores a los reportados por estos investigadores, mientras que el diámetro y peso de microcormos tuvieron valores similares.

Para cada especie, incluso para cada cultivar, además de utilizar el SIT apropiado, se debe definir el tiempo y la frecuencia de inmersión 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[®], afectó el número de brotes de los explantes, resultando mayor 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, produjo la regeneración de plantas con siete veces mayor biomasa fresca y seca promedio respecto al control, además, mostró las mayores tasas promedio de brotes. En otra investigación con BIT, utilizaron un ciclo de inmersión de un min por cada 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 (Busing *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 de *Lilium* con una morfología bien definida y un mayor tamaño (Lian *et al.*, 2014). Definitivamente, las necesidades en cuanto a tiempo de inmersión en el medio de cultivo, así como la frecuencia, van a variar en función de la especie e incluso de la variedad de planta de interés.

4.5.2. Volumen de medio de cultivo

El análisis de varianza (ANOVA) mostro efecto altamente significativo ($P \leq 0.01$) del volumen de medio de cultivo en número de brotes por explante, longitud de brote, número y biomasa de microcormos (Cuadro 4.3), el efecto fue significativo ($P \leq 0.05$) para número de raíces por brote, indicando 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 4.3. Análisis de varianza (Cuadrado medios) de las características de brote, y microcormo de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto del volumen del medio de cultivo por explante.

F.V.	GL	Brotes por explante (Núm.)	Longitud de brotes (mm)	Raíces por explante (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Mcormos (Núm.)	Diámetro de Mcormo (mm)	Biomasa de Mcormo (mm)
TRAT	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 ²		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; TRAT = Tratamientos, R² = Coeficiente de determinación, C.V.= Coeficiente de variación, Mcormos: microcormos.

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 4.4) (Figura 4.2). 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 4.4).



Figura 4.2. Efecto del volumen de medio de cultivo por explante, en el sistema de biorreactores de inmersión temporal (BIT), en la producción de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.

Cuadro 4.4. Características de brotes y microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam' por efecto del volumen del medio de cultivo por explante.

Volumen de medio (mL/explante)	Brotos por explante (Núm.)	Longitud de brotes (mm)	Raíces por explante (Núm.)	Longitud de raíz (mm)	Mcormos (Núm.)	Diámetro de Mcormo (mm)	Biomasa de Mcormo (g)
27.8	14.5 c	248.1 b	15.5 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	41.3 ab	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 ($P \leq 0.05$)	17.04	98.56	11.14	19.17	9.72	1.60	0.14

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSD, $P \leq 0.05$)

DMS: Diferencia mínima significativa, Mcormos: microcormos.

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.

La cantidad de microcormos formados, se favoreció 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, por lo que se obtuvo la mayor producción de estas estructuras de propagación (34.8 microcormos) al usar 55.6 mL de medio nutritivo, representando una diferencia de cuatro veces más microcormos en comparación de los obtenidos con volumen de 27.8 mL y 1.9 veces más con relación al uso de 41.7 mL. La biomasa del 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 este sentido, Othmani *et al.* (2017) en su investigación con palma datilera en SIT 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 Sistemas de Inmersión temporal, 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 Fera *et al.* (2003), comprobaron que el uso de BIT con una relación de 10 mL de medio de cultivo por explante influye en la multiplicación de gerbera, incrementando el número de brotes y comentaron 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 permite 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 camaldulenses*, se usaron 21 explantes, con 300 mL (14.28 mL por explante) de medio de cultivo, con un tiempo de inmersión de 15 min cada 2 h, evaluaron las condiciones de incubación en la obscuridad durante 15 días, y registraron número y largo de brotes (Mendonça *et al.*, 2016). También Rocano *et al.* (2017), evaluaron la multiplicación *in vitro* de *Juglans neotrópica*, en el sistema BIT para lo cual utilizaron frascos de vidrio con capacidad de 2 L que contenían 300 mL de medio de cultivo y 10 explantes, utilizaron un tiempo de inmersión de 2 min 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.

Por su parte, Basail *et al.* (2015) obtuvieron los mejores resultados con un tiempo de inmersión de 10 min 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 Sistema de Inmersión Temporal; 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 biorreactores de inmersión temporal (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 adecuados.

4.6. 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 var. 'Ámsterdam'.

4.7. LITERATURA CITADA

Aguirre G., J. Pierre, L. Leigue (2016) Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. *Universidad Mayor de San Simón, Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias, Forestales y Veterinarias. Cochabamba, Bolivia.* 240 p.

Albany, N. R., Vilchez, J. A., León, S., Nava, A. R., Martínez, L. J., and Molina, M. A. (2015) Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 17:24-31.

Albarrán J., E. Salazar, I. Trujillo, A. Vegas, A. González, A. Díaz, E. Vallejo, L. Castro, M. Torrealba and A. Silva (2014) Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. *Agronomía de la producción, IINIA Divulga* 28:2-8.

- Alvarenga S. y T. Salazar (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, and Gutiérrez, Y. (2015) Multiplicación del Cultivar de Plátano 'CEMSA ¾' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Agricultura Tropical* 1:32-41.
- Busing, E., A. Trifonova, C. Schneider, P. Rödel and U. Egertsdotter (2017) Evaluation of a New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation of Cultivars of *Eucalyptus*, Birch and Fir. *Forests* 8:1-9.
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., and Majada, J. P. (2001) Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*.
- De Fera Silva, M., Chávez Milián, M., Quiala Mendoza, E., and Jiménez González, 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., J. C. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, J. L. González D. and C. G. Borroto (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18:743-748.
- Escalona, M., Aragon, C. A., Capote, I., Pina, D., Ceja, I., Rodríguez, R., and Debergh, P. (2007) Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. *Acta horticulturae* 95-101.
- Etienne, H., and Berthouly, M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:215-231.
- García-Ramírez, Y., M. González-González, S. Torres García, M. Freire-Seijo, M. Pérez, Á. Trujillo and L. Rivero (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., M. R. Shukla, and P. K. Saxena (2016) An efficient temporary immersion system for micropropagation of *hybrid hazelnut*. *Botany* 94:1-8.
- Lian. M.L X., C. Piao and S., Y. Park (2014) Mass Production of *LiliumBulblets* in Bioreactors. Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology, *Springer* 390-415.
- Mendonça, E.G., V. C. Stein, H. H. de Carvalho, B. R. Santos, L. A. Beijo and L. V. Paiva (2016) The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. *Ciencia Florestal* 26:1211-1224.
- Mosqueda, O., M.M. Escalona and M.A Da quinta (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. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.
- Othmani, A., Ch. Bayoudh, A. Sellemi and N. Drira (2017) Temporary Immersion System for *Date Palm* Micropropagation. *Methods in Molecular Biology, Springer* 1637:240-249.
- Oviedo-Pereira, D., S. Alvarenga, S. Evangelista, G Sepúlveda, y M. Rodríguez-Monroy (2015) Microprogación de *Stevia rebaudiana* Beroni, un Cultivo Promisorio para México. *Biotecnología* 19:14-27.
- Rocano, M.N, P.G. Villena and D. F. Peña (2017) Evaluación de los sistemas de cultivo semisólido y BIT en la multiplicación in vitro de *Juglans neotrópica*. *MASKANA* 8:103-109.

Rosales, C., J. Brenes, K. Salas, S. Arce-Solano and A. Abdelnour-Esquivel (2018) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 24:69-84.

Ruffoni B. and M. Savona (2005) The Temporary Immersion System (T.I.S.) for the Improvement of Micropropagación of Ornamental Plants. *Acta Horticulturae* 683:445-449.

Ruffoni B., M. Savona and S. Barberini (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, NC, USA. 4424 p.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de esta investigación sugieren que la concentración de 50 mgL⁻¹ de NPsAg por 15 min de exposición tiene un efecto antimicrobiano en la desinfección de explantes, y el uso de 50 mgL⁻¹ de NPsAg como parte del medio de cultivo es una alternativa para desinfectarlo sin esterilizar en autoclave, obteniendo además respuesta favorable en el crecimiento de los explantes.

La mayor eficiencia de multiplicación de brotes y microcormos de gladiolo se logró en el cultivo en medio líquido en biorreactores de inmersión temporal (BIT) en comparación al medio semisólido y medio líquido en inmersión parcial, además, los microcormos se pueden recolectar con facilidad.

Los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), 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, podrían apoyar exitosamente al escalamiento en una explotación comercial de microcormos de gladiolo var. 'Ámsterdam'.

6. RECOMENDACIONES

Este trabajo da pauta para establecer una empresa productora de material vegetativo certificado de gladiolo, que cumpla con los estándares de calidad fisiológica, física, fitosanitaria y genética, para ofertar a los productores nacionales y del extranjero cormos comerciales que les permita ser competitivos en el mercado nacional e internacional. Al inicio, se trabajarían los materiales de dominio público, después se buscarían tratos con los obtentores de las marcas comerciales para establecer convenios de propagación dentro del marco legal.

7. LITERATURA CITADA EN INTRODUCCIÓN GENERAL

- Buschman, M. J. C. (1989) The Gladiolus cut flower as in zones tropicales y subtropical. International Center of flower bulb. Publisher International. Hillegom, Netherlands.
- Claridades agropecuarias (2006) La floricultura mexicana, el gigante que está despertando. La floricultura mexicana; flores de corte 154:3-38.
- Escalona M., Lorenzo J.C., González B., Daquinta M., Gonzalez J.L. Desjardins Y. and Borroto C.G. (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*.18:743-748.
- Hernández-Moreno, A. M., Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Barrera-Necha, L. L., León-Rodríguez, R., y García-Barrera, L. (2017) Etiología de la pudrición de cormos de gladiolo en almacén en Cuautla Morelos, México. *Revista mexicana de fitopatología* 35:476-493.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (2019) Estadísticas de balanza comercial de mercancías. Exportación de flor de corte de gladiolo.
- Memon, Noor-Un-Nisa. N. U N, N. A. Wahocho, T. F. Miano and M. H. Leghari (2016) Propagation of Gladiolus corms and cormels: A review. *African Journal of Biotechnology* 15:1699-1710.
- Mahasen, M., Ona, A. F., Taufique, T., Mehraj, H. and Jamal Uddin, A. F. M. (2015) Suitability of cut corm as planting materials on flowering and corm-cormel production of gladiolus cultivars. *Journal of Bioscience and Agriculture Research* 4:10-19.
- Muñiz (2018) La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable. *Tekhné* 21:43-50. <http://revistasenlinea.saber.ucab.edu.ve/temas/index>.
- Ramírez. G.Z. y J.L. Chávez S. (2014) Mejoramiento genético de ornamentales del Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México-ICAMEX.
- SIAP, Servicio de información agroalimentaria y pesquera (2019) Anuario estadístico de la producción agrícola. Consultado en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*"**, que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

María Andrade Rodríguez

DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado:
"Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*", que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. OSCAR GABRIEL VILLEGAS TORRES
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel (777) 329 70 76, 329 70 00, Ext. 3211 / fagropecuarias@uaem.mx

**UA
EM**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

“2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar”

Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*”**, que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia


DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*"**, que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. MANUEL DE JESÚS SAINZ AISPURO
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

“2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar”

Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*”**, que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 76. 329 70 00, Ext. 3211 / fagropecuarias@uaem.mx

**UA
EM**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

“2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar”

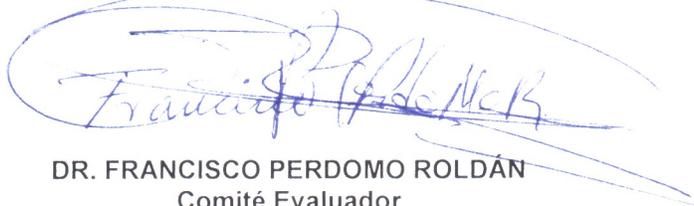
Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **“Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*”**, que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



DR. FRANCISCO PERDOMO ROLDÁN
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de noviembre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Nanopartículas de Ag para el cultivo aséptico y producción de cormos de gladiolo en tres sistemas de cultivo *in vitro*"**, que presenta: **M.C. JOSÉ ANTONIO CHÁVEZ GARCÍA**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ANDRADE RODRÍGUEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que el alumno continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. HÉCTOR SOTELO NAVA
Comité Evaluador

U. A. E. M.
RECIBIDO
29 OCT 2019
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

C.i.p. Archivo