



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

ESPECIALIDAD EN FLORICULTURA

TRABAJO TERMINAL

**PROPAGACION *in vitro* DE CULTIVARES
SOBRESALIENTES DE GLADIOLO IRRADIADO**

PRESENTA

VANESSA SANTANA MEJIA

ASESOR

DR. JESÚS RICARDO SANCHEZ PALE



**CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERILLO", EL CERRILLO
PIEDRAS BLANCAS, TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DEL
2019**

INDICE

Tabla de contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. JUSTIFICACIÓN	9
III. OBJETIVOS	10
III.I. OBJETIVO GENERAL:.....	10
III.II. ESPECIFICOS:.....	10
IV. HIPOTESIS	11
V. REVISION DE LITERATURA	12
V.I. ORIGEN DEL CULTIVO	12
V. II. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE GLADIOLO.....	12
V.III. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA DEL GLADIOLO	13
V.IV. PROPAGACIÓN DEL GLADIOLO	14
V.IV.I. CORMO	15
V.IV.II. CORMILLOS O CORMELOS.....	16
V.IV.III. RAÍZ.....	17
V.IV.IV. HOJAS	17
V.IV.V. FLORACIÓN	17
V.V. REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS.....	18
V.V.I. TEMPERATURA.....	18
V.V.III. HUMEDAD RELATIVA	19
V.V.IV. SUELO	20
V.V.V. FERTILIZACIÓN	20
V.VI. PLANTACIÓN ^[L] _[SEP]	21
V.VI.I. ÉPOCA DE PLANTACIÓN	21
V.VI.II. DENSIDAD.....	21
V.VI. III. PROFUNDIDAD DE PLANTACIÓN	22
V.VII. RIEGO	22
V.VIII. CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CTV)	23
V.IX. IRRADIACIÓN	27
VI.I. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	28
VI.III. MATERIAL GENÉTICO.....	29
VI.IV. VARIEDADES	29
VI.V. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO.....	29
VI.V.I. MATERIALES ^[L] _[SEP] PARA LA ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	30
VI.V.II. METODOLOGÍA PARA LA ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	31
VI.VI. TRATAMIENTO PREVIO DE LOS CORMILLOS CON FUNGICIDA.....	33
VI.VII. DESINFESTACION DE CORMILLOS EN EL LABORATORIO	34
VI.VIII. SIEMBRA DE TEJIDOS.....	35
VI.IX. VARIABLES A EVALUAR	36
VI.X. ADAPTACIÓN DE PLÁNTULAS.....	37
VII. ANÁLISIS DE DATOS.....	38

VIII.I. TRATAMIENTO PREVIO CON FUNGICIDAS.....	39
VIII.III. MEDIA DEL NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS POR TRATAMIENTO.....	45
IX. CONCLUSIONES	47
X. PRODUCTO ENTREGABLE	48
XI. BIBLIOGRAFIA.....	50

RESUMEN

En el sistema de producción de gladiolo existe la necesidad de disponer semilla asexual sana y en buena condición física. La propagación *In vitro* es una alternativa viable que nos permite disponer de semilla sana. El uso de cormos en plantas bulbosas bajo la técnica de micro propagación es una gran ventaja en comparación con la propagación convencional, debido a que por medio de las técnicas de reproducción *In vitro* se puede obtener material con óptimas condiciones fitosanitarias en menor tiempo, otra de las ventajas es el aumento masivo de la producción mediante el manejo de las hormonas de crecimiento como la Bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (ANA), Kinetina (Kin), así como manejar los ciclos de multiplicación *in vitro* con la finalidad de una multiplicación masiva en un corto tiempo. En el presente trabajo las plantas de Gladiolo de cultivo *in vitro* se obtuvieron a partir de cormillos en medio basal Murashige y Skoog (MS) adicionado de sacarosa mas hormonas. La mayor formación de brotes por cormillo se obtuvo en medio MS suplementado con 1.0 µM de bencilaminopurina en combinación con .5 µM ácido naftalenacético y MS suplementado con sacarosa mas 1.0 µM bencilaminopurina en combinación con .5 µM ácido naftalenacético. En la etapa de adaptación los brotes enraizados lograron una supervivencia del 100% en condiciones bajo invernadero.

ABSTRACT

In the system of production of gladiolus there is a need to arrange asexual seed healthy and in good physical condition. In vitro propagation is a viable alternative that allows us to have healthy seed. The use of corms in bulbous plants under the technique of micro propagation is a great advantage compared to conventional propagation, due to the fact that through in vitro reproduction techniques material with optimal phytosanitary conditions can be obtained in less time, another of the advantages is the massive increase in production through the use of growth hormones such as benzylaminopurine (BAP), indolemal acid (ANA), kinetin (kin), as well as handling in vitro multiplication cycles for the purpose of multiplication massive in a short time. In the present work Gladiolus plants of in vitro culture were obtained from cormillos in basal medium Murashige and Skoog (MS) added sucrose plus hormones. The highest formation of shoots per cormillo was obtained in MS medium supplemented with 1.0 μM of benzylaminopurine in combination with .5 μM naphthaleneacetic acid and MS supplemented with sucrose plus 1.0 μM benzylaminopurine in combination with .5 μM naphthaleneacetic acid. In the adaptation stage the rooted shoots achieved a 100% survival under greenhouse conditions.

I. INTRODUCCIÓN

La floricultura es una disciplina que se deriva de la horticultura, esta orientada al cultivo de flores y plantas ornamentales en forma industrializada para darle diversos usos como la decoración, la cosmética o la medicina. Es una actividad intensiva que genera recursos económicos gracias a la explotación comercial de plantas como: flores de corte, plantas ornamentales, follaje y bulbos de flor. En México la producción de ornamentales genera tres mil 600 millones de pesos, con la producción de distintas variedades como: Gladiola, Crisantemo y Rosa, además de plantas de ornato y forraje, el 80% se destina al mercado nacional y el resto a la exportación (Hidroponia, 2018).

Los gladiolos son plantas que se desarrollan a partir de un cormo y su inflorescencia se caracteriza por ser una espiga. El cormo es una base hinchada de tallo envuelto por hojas secas con apariencia de escamas; es una estructura sólida con varios nudos y entrenudos y la mayor parte contiene tejido de almacenaje formado por células parenquimatosas. El cormo es de consistencia dura y de forma redonda el cual dura un año siendo remplazado por nuevos cormillos que se forman en él, los cuales son utilizados para la multiplicación comercial (Gutiérrez, 2010, citado por Ordoñez, 2010).

El cultivo de cormos de gladiolo es muy importante en Francia y Holanda donde se manejan con avanzada tecnología. En estos países los cormos son suministrados en cualquier época del año, obteniendo una buena demanda debido al bajo precio del cormo y a la corta duración del cultivo. Hoy en día se han desarrollado variados cultivares mediante múltiples cruzamientos, obteniendo híbridos

heterocigóticos; dicha clasificación se hace por precocidad, tamaño y color (Dole y Wilkins, 2004, citado por Ordoñez, 2010). Holanda y otros países de Europa, así como Brasil y México en América son productores de flor de gladiolo para exportación (Chandel y Deepika, 2010, Citado por Enrique González Pérez, 2011). En México, el gladiolo ocupa el tercer lugar en importancia, con 2.2 mil hectáreas sembradas, después de la rosa (*Rosa spp.*) y el crisantemo (*Chrysanthemum spp.*). Los principales estados productores son: Puebla (San Martín Texmelucan y Atlixco, donde se siembra 54 % de la producción nacional), estado de México (Chalma, Malinalco, Valle de Bravo y Villa Guerrero), Michoacán, Morelos y Veracruz (SIAP, 2018).

La propagación del gladiolo se puede hacer por métodos sexuales o asexuales ya sea por medio de técnicas de propagación convencional o utilizando técnicas más sofisticadas y modernas como la reproducción in vitro. La reproducción convencional se lleva a cabo por medio de cormillos extraídos a partir de la planta al momento de arrancar los cormos. Cada uno de los cormos extraídos está rodeado de pequeños cormillos, los cuales se aíslan para ser sembrados en el suelo; estos cormillos se recogerán y se aislarán en otoño, para ser plantados en la primavera siguiente conservándolos en un ambiente seco (Gutiérrez, 2010, citado por Ordoñez, 2010).

La micropropagación es una técnica utilizada en plantas con limitaciones particulares en la horticultura convencional. El uso de cormos en plantas bulbosas en la micropropagación es una gran ventaja en comparación con la propagación convencional, debido a que por medio de las técnicas de reproducción in vitro se

puede obtener material libre de virus y otros patógenos. Otra de las ventajas, según estudios realizados, es que por medio de la micropropagación se puede obtener un aumento masivo de la producción mediante el manejo de las hormonas de crecimiento como la Bencilaminopurina (BAP), los ciclos de multiplicación in vitro (Faheem *et al.* 2008, citado por Ordoñez Vargas, 2010).

En el medio del cultivo in vitro se puede producir plantas en menor tiempo y con óptimas condiciones fitosanitarias en comparación con el método de propagación convencional (Chawla, 2007, citado por Ordoñez, 2010). El objetivo de este estudio fue establecer un experimento para la reproducción in vitro de *Gladiolus grandiflorus* a partir de cormillos donde se realizaron seis tratamientos de medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de hormonas (bencilaminopurina, ácido indolacético, kinetina) cada tratamiento constó de cinco repeticiones.

II. JUSTIFICACIÓN

En México el gladiolo es un cultivo de suma importancia por la fuerte actividad económica que genera debido a la preferencia que como flor de corte tiene entre los consumidores de nuestro país. Sin embargo es un cultivo muy susceptible a plagas y enfermedades que generan pérdidas económicas y suelos infestados que propician un comportamiento nómada de los productores. Es atacado por un gran número de plagas que van reduciendo su vigor aunado a su continua multiplicación vegetativa que origina el llamado degeneramiento de la variedad, por lo que es necesario limpiar dicho material de posible patógenos así como rehabilitar el material genético. Por otro lado, en México se carecen de variedades con cierto nivel de resistencia a los diferentes problemas fitosanitarios que presenta el cultivo; finalmente, existen pocas variedades disponibles en el mercado por lo que es necesario generar variedades con cierto nivel de resistencia a plagas, así como recuperar el vigor de cada variedad. Ante esta situación, con el presente trabajo se pretende propagar in vitro a los cultivares resultantes y sobresalientes de la irradiación realizada a la variedad roja y blanca borrega con la finalidad de mantener y reproducir a dichos cultivares a partir de cormillos para mantener la sanidad e identidad de cada cultivar.

III. OBJETIVOS

III.I. OBJETIVO GENERAL:

- Propagar in vitro cultivares sobresalientes de *Gladiolus grandiflorus* irradiados y no irradiados a partir de cormillos.

III.II. ESPECIFICOS:

- Identificar el cultivar de *Gladiolus grandiflorus* irradiado que mejor responda a la propagación in vitro a partir de cormillos.
- Evaluar al cormillo para la propagación In vitro de *Gladiolus grandiflorus* irradiado.
- Obtener plantas a partir de cultivos de tejidos de cada cultivar sobresaliente para ensayos de confrontación con plagas.
- Obtener plantas de gladiolo no irradiadas y de dominio publico a partir de cormillos para ofertarse a los productores.

IV. HIPOTESIS

- Al menos un cultivar sobresaliente de *Gladiolus grandiflorus* irradiado expresará una mejor respuesta a la propagación in vitro a partir de cornillos.

V. REVISION DE LITERATURA

V.I. Origen del cultivo

El gladiolo es una de las flores de corte mas importante en el mundo; es originario de África Austral y la cuenca mediterránea. Comprende 180 especies nativas de África, Madagascar, Europa, Arabia y oeste de Asia, donde el gladiolo crece de manera espontanea. Se ha cultivado desde la antigüedad, en la época de los griegos y los romanos *Gladiolus* es el diminutivo de *Galdius*, que significaba “espada”, por un lado se refiere a la forma de la hoja que es lanceolada terminando en punta y también por el hecho de que la flor en la época de esplendor del imperio romano era entregada a los gladiadores que triunfaban en la batalla; por eso la flor es símbolo de la victoria (INFOAGRO, 2018).

V. II. Importancia económica del cultivo de gladiolo

Los hortícolas del gladiolo se han obtenido desde comienzos del siglo XIX por cruzamientos entre diversas especies botánicas. Hoy en día existen mas de tres mil variedades de gladiolos, de los cuales son aprovechables comercialmente alrededor de 300 que muestran una gran diversidad de tamaño, color, forma de la flor y época de floración.

Actualmente la reproducción in vitro y la ingeniería genética ha venido a revolucionar la industria de este cultivo.

Para la floricultura en México se destinan mas de 22 mil hectáreas, las cuales se dividen en 26 estados del país, siendo el Estado de México el principal productor, ya que aporta el 53% de la producción total a nivel nacional; seguido de la Ciudad de México con 17%; de Jalisco y Morelos quienes aportan el 8% y Puebla quien al año aporta 6%. El resto se distribuye en otros estados como Colima, Chiapas, Michoacán y Tabasco, etc.

Con lo mencionado anteriormente en el país existen mas de 10 mil productores distribuidos a lo largo de toda la Republica, los cuales se dedican principalmente al cultivo de rosas, gerberas, crisantemos, anturios, tulipanes, gladiolas y claveles, así como a la producción de esquejes, plántulas y ciertos tipos de follaje.

La floricultura esta profundamente enraizada en la tradición cultural y productiva del país, por esta razón México ha jugado un papel muy importante en el mercado internacional de flores, lo cual lo coloca en el 4º lugar en la lista de los productores mas importantes a nivel mundial y en el 7º sitio como exportador con un 20% del total de la producción, donde estados Unidos y Canadá son los principales consumidores (HIDROPINIA, 2018).

V.III. Taxonomía y morfología del gladiolo

El gladiolo pertenece a la clase Monocotyledoneae, familia Iridaceae (Cuadro I). Es una planta herbacea y se desarrolla a partir de un tallo modificado subterráneo llamado cormo que funciona como una estructura de reserva. El gladiolo se caracteriza por su inflorescencia en espiga y cormos de renovacion anual que

durante el desarrollo vegetativo dan un promedio de 5 a 16 cormillos dependiendo de la variedad (Vidalie 2001; Leszczyńska y Boris 1994, citado por García, 2014).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del gladiolo

Clasificación taxonómica del gladiolo	
Reino	Plantae
Divison	Magnoliopyta
Clase	Liliopsida (monocotiledoneas)
Orden	Liliales
Familia	Iridaceae
Subfamilia	Ixioideae
Genero	Gladiolus
Especie	G. grandiflorus

Fuente: Leszczyńska y Borys, 1994, citado por García , 2014.

V.IV. Propagación del gladiolo

La propagación de la planta del gladiolo es a través de semilla (asexual) o de cormo (asexual). La propagación a través de semilla solo se emplea para mantener poblaciones de especies silvestres o para obtener plantas con características distintas a las de sus progenitores. La propagación asexual se

utiliza para conservar las características genéticas así como para la producción comercial de flores (Leszczyńska y Borys 1994, citado por García, 2014).

V.IV.I. Cormo

El cormo es una estructura sólida que se forma en las yemas axilares de las hojas de un tallo robusto y suculento que proporciona los nutrientes necesarios para la nueva estructura. Tienen forma redondeada algo achatada, con un ápice de crecimiento en el centro de la zona superior, cubierto por delgadas hojas escamosas que lo protegen del daño físico y de la pérdida de agua. Éste desarrolla raíces adventicias ventrales o basales. El ápice del cormo es un vástago terminal que se desarrollará en las hojas y en un vástago floral terminado por una inflorescencia (Rojas *et al.*, 2004, González-Pérez 2011, García-López *et al.* 2012, citado por García, 2014). Cada año, se forma como mínimo, un cormo nuevo de diferente tamaño (Figura 1), los cuales son agrupados por calibres comerciales 14, 12/14, 10/12, 8/10 y 6/8 (García-López *et al.*, 2012, citado por García, 2014).



Figura 1. Cormo de gladiolo tomado de Chahín et al. 2007, citado por Teresa García Quintero, 2014.

V.IV.II. Cormillos o cormelos

Son pequeñas estructuras de un calibre menor a 6 cm de perímetro que se producen en la unión entre el cormo nuevo y el cormo viejo. Los cormillos necesitan de uno o dos años de cultivo para dar lugar a un nuevo cormo, apto para la producción de flor (Landeras *et al.* (2003), citado por García, 2014).

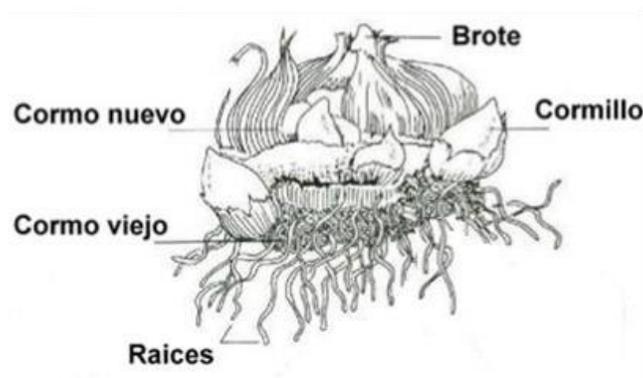


Figura 2. Estructura del cormo y cormillos tomado de Vidalie 2001, citado por García, 2014.

V.IV.III. Raíz

El gladiolo forma dos tipos de raíces; las fibrosas que se desarrollan en la base del cormo viejo y las que se originan en la base del cormo nuevo que son gruesas, carnosas y contráctiles las cuales realizan la función de absorción (Lezczyńska y Borys 199, citado por García, 2014).

V.IV.IV. Hojas

Son alargadas, lanceoladas y paralelinervas recubiertas de una cutícula cerosa, sobrepuestas en la base y pueden variar de ocho a doce hojas que miden de 1-8 cm de ancho (González- Pérez 2011, IFBC 2012, citado por García, 2014).

V.IV.V. Floración

El gladiolo comienza a formar la espiga floral cuando aparece la tercera o cuarta hoja, es decir, entre las cuatro o seis semanas después de la plantación (Buschman 1984, Vidalie 2001, citado por García, 2014). Por otra parte, no todos los cormos son capaces de producir un tallo floral ya que esto está en función del

tamaño del cormo, la densidad de siembra y la intensidad y duración de luz.

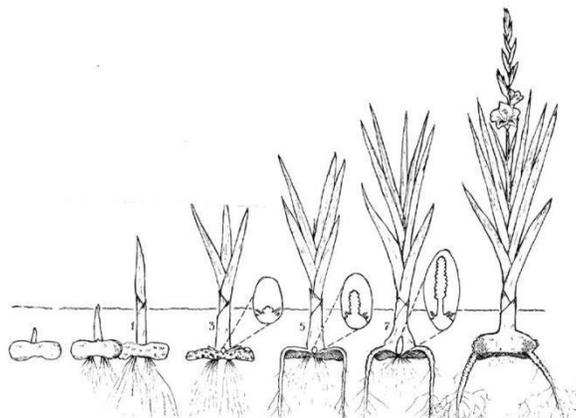


Figura 3. Fenología del cultivo. En la etapa 3 se muestra el momento en que empieza a formarse la flor por el interior del cormo tomado de Buschman 1984, citado por García, 2014.

V.V. Requerimientos climáticos

V.V.I. Temperatura

Las temperaturas óptimas para el desarrollo del gladiolo son entre 10 y 25°C, los cormos rompen latencia y brotan a una temperatura de 10-12°C las superiores a 30 °C inhiben el crecimiento de las plantas. La temperatura ambiental óptima para el desarrollo vegetativo del cultivo es de 10-15°C por la noche y de 20-28°C por el día, temperaturas bajo 5-6°C pueden provocar muerte del follaje y aborto de flores. Para la formación del tallo floral se requieren temperaturas desde los 12°C a los

22°C (Buschman 1984, Leszczyńska y Borys 1994, Chahín *et al.* 2007, IFBC 2012, citado por García, 2014).

V.V.II. Iluminación

El gladiolo es una planta heliófila que en botánica significa amante del sol y de fotoperiodo largo. Durante periodos de poca luz es importante incrementar la intensidad lumínica considerando factores como: densidad de plantación, arreglo de la siembra de los cormos, dirección de las hileras, cercanía de árboles y el requerimiento lumínico del cultivar. El periodo más crítico para la planta es a partir de la aparición de la tercera hoja hasta cuando son visibles la sexta y séptima, en este periodo ocurre la iniciación floral y se deben dar las mejores condiciones de luminosidad (Buschman 1984, Leszczyńska y Borys 1994, Chahín *et al.* 2007, citado por García, 2014).

V.V.III. Humedad relativa

La humedad ambiental debe estar comprendida entre el 60-70%, la inferior al 50% provoca un crecimiento lento, u n exceso de humedad produce elongación en la planta y se presenta pudrición en cormos por enfermedades (Anónimo 2010, citado por García, 2014).

V.V.IV. Suelo

El gladiolo generalmente se puede cultivar en todos los tipos de suelo siempre y cuando sean ricos en materia orgánica, de buena estructura y buen drenaje, la estructura del suelo es más importante que el tipo de textura, una estructura inadecuada puede disminuir el rendimiento del cormo hasta en un 30%. Un pH entre 6 y 7 es esencial para el desarrollo de la raíz y para la absorción de nutrientes. Además se requiere especial cuidado en el contenido de sales en el suelo ya que las altas concentraciones retrasan el crecimiento de la raíz y también pueden poner en peligro la floración debido a que la planta disminuye su capacidad de absorber agua, el sistema radical se endurece, se vuelve frágil y es más susceptible al daño físico. Para corregir este problema se recomienda regar con mayor frecuencia (Leszczyńska y Borys 1994, Chahín *et al.* 2007, IFBC 2012, citado por García, 2014).

V.V.V. Fertilización

El gladiolo no se beneficia de grandes aportaciones de fertilizante, sino de la disponibilidad constante de los nutrientes. Los requerimientos nutricionales del gladiolo dependen del cultivar, tamaño del cormo, de la cantidad de reservas y de la etapa de desarrollo. Se aconseja fraccionar la fertilización en la fase de plantación, emisión de la segunda y de la cuarta hoja y al inicio del espigamiento; las dosis de fertilizante deben ser calculadas en base a un análisis químico del

suelo y en el análisis de las partes indicadoras de las plantas (hojas plenamente desarrolladas) para procurar un balance nutricional de la planta (Leszczyńska y Borys 1994, Chahín *et al.* 2007, Anónimo 2010, IFBC 2012, citado por García, 2014).

V.VI. Plantación

V.VI.I. Época de plantación

La fecha de plantación de los cormos depende del clima y tipo de suelo; en las regiones cálidas se puede plantar en cualquier época del año, desde enero hasta mayo (plantaciones tempranas) y de junio hasta agosto (plantaciones tardías); en zonas con heladas en invierno, las plantaciones se realizan desde marzo a mayo para obtener flores desde el verano hasta el otoño (Leszczyńska y Borys 1994, citado por García, 2014).

V.VI.II. Densidad

En México en las regiones de producción comercial la densidad de plantación es de 120 a 150,000 cormos por hectárea. Sin embargo, la densidad depende de la variedad, tamaño del cormo, época y sistema de producción. (Leszczyńska y Borys 1994, Chahín 2006, Anónimo 2010, citado por García, 2014).

V.VI. III. Profundidad de plantación

La profundidad de plantación depende del tamaño del cormo, tipo de suelo y época de plantación, en general en suelos arenosos la profundidad es mayor (15 cm) que en suelos arcillosos (10 cm). La profundidad y distancia de plantación en la primavera es de 5 a 10 cm para asegurar una mayor resistencia al viento y para evitar el acame de las plantas (Figura 4). Durante el verano conviene sembrar a mayor profundidad 10 a 15 cm para evitar algunas enfermedades debidas a la elevada temperatura del terreno (Leszczyńska y Borys 1994, Chahín 2007, Anónimo 2010, IFBC 2012, citado por García, 2014).

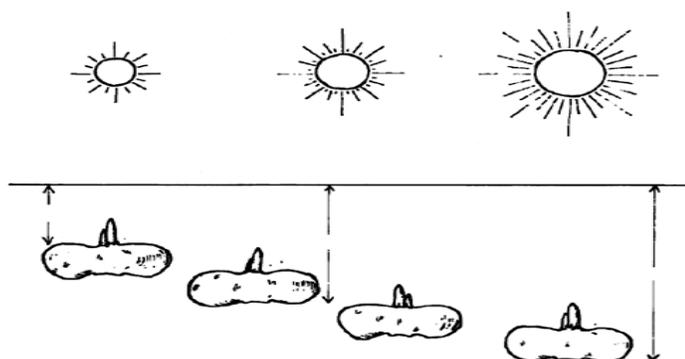


Figura 4. Profundidad de plantación en gladiolo según la época del año tomado de Chahín 2007, citado por García, 2014.

V.VII. Riego

Se debe hacer un riego antes de la plantación y si es necesario debe regarse nuevamente después de ella; la planta necesita bastante humedad en el suelo

desde el inicio del cultivo para permitir un adecuado desarrollo radicular. Cuando la planta está en el segundo par de hojas se debe regular el suministro de agua para que la planta genere una vara de buena calidad. Los periodos en que la planta requiere una mayor demanda de agua son en la fase de iniciación de la inflorescencia, desarrollo de las raíces contráctiles y después de la floración. Luego la demanda de agua disminuye pero se debe seguir regando hasta que el follaje comience a tornarse amarillo. De ahí se suspende el riego para favorecer la formación de la túnica en los cormos (Leszczyńska y Borys 1994, Chahín 2007, IFBC 2012, citado por García, 2014).

V.VIII. Cultivo *in vitro* (CTV)

En 1904 Hanning desarrolló un nuevo método de cultivo de plantas al que se llamó cultivo de embriones. Aisló *in vitro* embriones inmaduros de algunos miembros de la familia Cruciferae, obteniendo plántulas viables (Villalobos, 1990, citado por Enrique González Pérez, 2011).

El nombre de cultivo *in vitro* (cultivo en vidrio), se utilizó porque, inicialmente, se usaron recipientes de vidrio para el cultivo. Así que el término cultivo *in vitro* puede definirse como el cultivo en un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Esta técnica se caracteriza por:

- ❖ Producción a micro-escala.

- ❖ Optimiza las condiciones ambientales, en lo que se refiere a factores físicos, nutricionales y hormonales;
- ❖ Excluye todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos).

Los cultivos in vitro pueden iniciarse a partir de cualquier parte de la planta (tallos, hojas, semilla, fruto, embrión, cotiledones, raíz, etc.). Comúnmente se selecciona aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como la región meristemática. Se utilizan pequeños segmentos de tejido inoculados en medios semisólidos, en los cuales, dependiendo de los reguladores de crecimiento utilizados, es posible inducir con cierta facilidad la formación de callos (Ochoa, 1990). Generalmente no se reproducen plantas bajo el patrón normal de desarrollo. El resultado es un tejido aislado que puede dar origen a un callo o puede desarrollar otras formas poco usuales (formación de órganos, embriogénesis somática). La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes eran imposibles. Siendo el fundamento teórico del cultivo in vitro el concepto de la totipotencialidad celular (Villalobos, 1990).

Murashige y Skoog (1962) observaron que el esperma de arenque, desnaturalizado por calor, tenía un efecto muy marcado en la formación de brotes a partir de tejidos de tabaco. De este ácido desoxirribonucleico (ADN) desnaturalizado Miller et al., (1955) aisló un compuesto de naturaleza purínica denominado 6- furfuril-aminopurina o kinetina.

En 1926 dos científicos japoneses descubrieron un compuesto hormonal,

actualmente de uso ordinario en el cultivo in vitro de tejidos vegetales denominado Giberelina, el cual es producido por un hongo *Gibberella fujikouroi*; este compuesto fue descubierto cuando se estudiaba la causa de la pudrición en plántulas de arroz. El efecto que producía dicha sustancia era un alargamiento excesivo en los tallos, sin desarrollo proporcional de la raíz (Razdan, 2003). Actualmente se le atribuyen otros efectos como la inducción de germinación en semillas, brotación en algunos tubérculos como la papa etc.

Altos rendimientos pueden ser obtenidos en cultivo de callo o en cultivo de células en suspensión en comparación con los obtenidos en plantas completas, ya que mediante CTV se tiene la ventaja que no hay problemas de plagas, enfermedades ni cambios climáticos que afecten el rendimiento del producto (Lindsey y Jones, 1992).

El cultivo in vitro de gladiolo ha sido reportado por varios autores (Ziv et al., 1970; Simonsen y Hildebrandt, 1971; Hussey, 1977; Ziv, 1979; Ziv, 1989; Steinitz *et al.*, 1991). Sin embargo el trasplante y establecimiento de plántulas producidas in vitro no ha sido fácil por la influencia de diversos factores bióticos y abióticos (Dantu y Bhojwani, 1987). Se han encontrado resultados satisfactorios en la generación de nuevas variedades, pero en lo referente a la sanidad del cormo no se ha logrado la total erradicación de los patógenos que se transmiten por medio del cormo (Bajaj *et al.*, 1983).

Efecto de las hormonas en el desarrollo in vitro del gladiolo^[SEP] Las auxinas y citocininas, estimulan la división celular, lo cual tiene efecto estimulante sobre el

crecimiento del tallo, y en consecuencia la diferenciación del cambium, del xilema y floema (Taiz y Zeiger, 2006).

En gladiolo el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolbutírico (IBA), 6-bencilamino purina (BA), Kinetina (Kn) y Zeatina (Za), han resultado ser buenos promotores de la formación del cormo en el cultivo in vitro (Ziv *et al.*, 1970; Hussey, 1977; Ziv, 1989; Steinitz *et al.*, 1991). Estas auxinas y citocininas promueven la diferenciación del tallo en la capa superficial del explante. Una de las funciones de las auxinas durante la mitosis en la organogénesis es la formación de un número crítico de células en división activa, las cuales son capaces de responder a señales de desarrollo (Hartmann *et al.*, 1990). Estas zonas de división celular resultan de la capacidad misma de células divisorias que existen en el tejido. Inicialmente solo algunas células se vuelven meristemáticas y comienza el desarrollo del tallo, como una pequeña protuberancia de la capa epidermis/sub-epidermis del explante, posteriormente esas protuberancias son precursoras de la formación de estructuras más organizadas (yemas) (Dantu y Bhojwani, 1994; Kumar *et al.*, 1999).

El engrosamiento y alargamiento del tallo es ocasionado por las citocininas (Zeatina o Kinetina) y giberelinas (GA₃) pues promueven la formación del cormo. Las giberelinas promueven la activación de la de α -amilasa que produce azúcar y que es almacenada en las células del tallo basal, al mismo tiempo que las citocininas y auxinas promueven la elongación celular del tallo, que dará como resultado el engrosamiento a sus extremos lo cual induce la tuberización y la

formación del corno (El-Rahman *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1990; Rees, 1993).

V.IX. Irradiación

En México el proceso de irradiación gamma se lleva a cabo desde 1980 en la Planta de Irradiación Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), ubicada en el kilómetro 36.5 de la carretera México-Toluca en La Marquesa, Estado de México. Se trata de un proceso de sanitización de productos efectivo e inocuo, que en el ININ opera bajo la certificación ISO 9001: 2008. El servicio de irradiación gamma consiste en exponer los productos a una dosis específica de radiaciones gamma provenientes de una fuente radiactiva de cobalto-60, de tal manera que la energía que reciban sea la suficiente para desbacterizarlos o esterilizarlos, sin que esto afecte su estado físico o sus características organolépticas. Se trata de un proceso en frío y sin reacciones químicas que puedan afectar al producto.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.I. Ubicación del experimento

El experimento se realizara en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrícolas UAEMéx en el laboratorio de cultivos vegetales, en el Cerrillo Piedras Blancas.

VI.II. Metodología del experimento

El presente trabajo es la continuación a los resultados obtenidos por Piña (2019) quien obtuvo plantas sobresalientes (mayor altura, mayor grosor del tallo y probablemente algún tipo de resistencia a alguna enfermedad) en las dos variedades evaluadas y que requieren su propagación In vitro para mantener su identidad.

Comprende dos Etapas:

1. Etapa de ensayo para la propagación de cultivares de dominio publico
2. Etapa con la metodología definida para realizar la propagación con el material sobresaliente.

VI.III. Material genético

El material genético con el que se trabajo son las cultivares sobresalientes obtenidos a partir de material irradiado de las dosis de 10 a 100 Gy de la variedad blanca y roja borrega; que se encuentra en el Invernadero # 1 de la facultad.

VI.IV. Variedades

Las variedades de dominio público a utilizar para este trabajo son Roja y Blanca borrega.

Flor de color blanco. Su presentación es calibre 0.12 m /0.14 m, 10 bulbos. La época de plantación es después de las heladas, la época de floración es verano la profundidad de siembra es 0.1 m con un distanciamiento de 0.12 m, la altura de la planta es 0.1 m (Gutiérrez-Gómez, 2013).

VI.V. Preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el establecimiento del experimento de cormillos de *Gladiolus* sp. Fue el medio basal MS adicionado con sacarosa suplementado con BAP, una citocinina sintética muy usada para estimular el crecimiento de brotes y la inhibición de formación de raíces, ANA una auxina un agente de enraizamiento.

La fórmula de Murashige y Skoog (1962) se empleará como ejemplo para los propósitos de este procedimiento, pues se ha demostrado que es el medio

adecuado para una gran variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta.

VI.V.I. Materiales ^[L]_[SEP] para la elaboración del medio de cultivo

Material de laboratorio:

Equipos: ^[L]_[SEP]

- 1 balanza analítica ^[L]_[SEP]
- 1 placa de agitación con calentamiento
- 1 matraz Erlenmyer de 2 000 ml ^[L]_[SEP]
- 8 matraces Erlenmeyer de 250 ml ^[L]_[SEP]
- 10 ampolletas de plástico de 250 ml ^[L]_[SEP]
- 2 espátulas ^[L]_[SEP]
- Charolas de pesado

Reactivos:

- Reactivos para medio de cultivo MS (1962) ^[L]_[SEP]

- 1 000 ml de agua destilada [L]
[SEP]

VI.V.II. Metodología para la elaboración del medio de cultivo

Preparación de Sales Minerales. [L]
[SEP] Para la preparación de las soluciones concentradas se deberán disolver las sales indicadas en las proporciones marcadas. [L]
[SEP]

Tabla 1. En la siguiente tabla se muestran los reactivos y dosis para la elaboración del medio MS.

Nutriente		
Macronutrientes	Formula	Dosis g/L
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	16.5
Nitrato de potasio	KNO ₃	19
Cloruro de calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	1.7
Micronutrientes		
Etilendinitrilotetracetato	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	.373
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	.278

Sulfato de manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	.223
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	86 mg
Acido bórico	H ₃ BO ₃	62 mg
Yoduro de potasio	KI	8.3 mg
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2.5 mg
Sulfato cúprico	CuSO ₄ .5H ₂ O	.25 mg
Cloruro de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.25 mg
Vitaminas		
li - Inositol		1
Niacina (acido nicotinico)		5 mg
Piridoxina HCl		5 mg
Tiamina HCl		1 mg

Nota:

- 1.- Algunos autores utilizan solo 33.6 g/L de Na₂EDTA
- 2.- El FeSO₄.7H₂O y Na₂EDTA se deben disolver juntos en agua tibia aparte.
- 3.- El CaCl₂.2H₂O algunas veces se precipita, por lo que también se disuelve aparte.
- 4.- La cantidad de agar variara en respuesta del tipo de medio (solido, semisólido o liquido) y de la cantidad del mismo dependiendo de la marca, entre 4 a 12 g/L.

5.- Por facilidad al momento de pesar los reactivos; se elaboran 10 L de medio e cultivo en forma concentrada en 1L, los cuales pueden conservarse congelados hasta que se requieran usar.

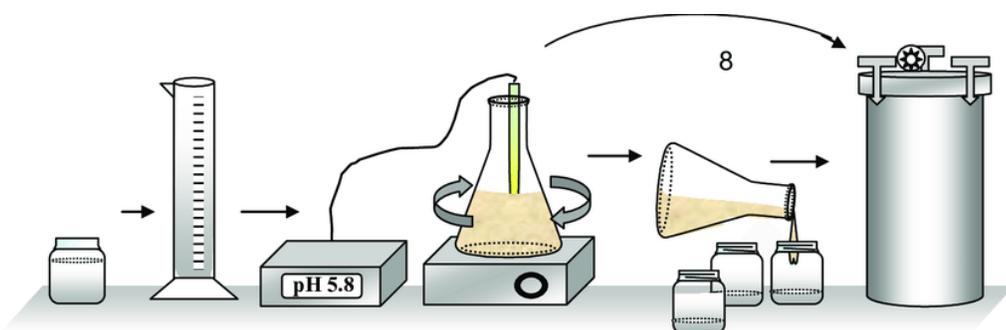


Figura 5. Representación de la metodología para la preparación del medio MS.

VI.VI. Tratamiento previo de los cormillos con fungicida

Los cormillos utilizados para la propagación *in vitro* se colocaron en inmersión con diferentes fungicidas por 24 horas a una dosis de 1g/L de agua (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamiento previo con fungicida de los cormillos

TRATAMIENTO PREVIO DE LOS CORMILLOS CON FUNGICIDAS		
Producto	Ingrediente activo	Dosis
Terramicina agricola 5%	Clorhidrato de oxitetraciclina	1g/L
Pireos 70	Tiofanato metilico	1g/L
Sportak 45	Procloraz	1g/L
Rovral 50	Iprodione	1g/L
Captan 50	Carboxamida	1g/L

VI.VII. Desinfestacion de cormillos en el laboratorio

Los cormillos a desinfectar no deberán de presentar ningún daño físico es decir, deberán de estar lo mas sanos posible.

El proceso para la des infestación de cormillos en el laboratorio consistió en:

- a) Lavar los cormillos con agua jabonosa. [L]
[SEP]
- b) Sumergirlos en etanol al 70% durante 1 minuto. [L]
[SEP]
- c) Los cormillos se ponen en inmersión con hipoclorito de sodio al 1.0% durante 15 minutos.
- d) Los cormillos se colocan en inmersión con agua destilada estéril con gentamicina a una concentración de 5 mg/L (200 micro litros en 100 ml) durante 10 minutos.
- e) Los cormillos se colocan en inmersión con microdin (3 gotas por fracso) durante 15 minutos, a partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar posteriormente se enjuaga el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada.
- f) Los cormillos se siembran en los frasco con medio de cultivo. [L]
[SEP]
- g) Colocar los frascos de cultivo en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de [L]
[SEP] 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24oC. [L]
[SEP]
- h) Observar cada tercer día el desarrollo de sus cultivos. Anotar los cambios

en la apariencia de los explantes. Separar los frascos con explantes necrosados y contaminados y registrar si se trata de contaminación bacteriana o fúngica.

VI.VIII. Siembra de tejidos

La siembra de los cormillos desinfectados y considerados como explantes, para su propagación de gladiolo, se requiere de:

1. Tomar el cormillo del vaso de precipitado y colocarlo en una caja Petri con ayuda de pinzas estériles.
2. Colocar los frascos con los cormillos en el cuarto de incubación, con fotoperiodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24°C.
3. Utilizar pinzas y bisturíes estériles para trabajar con el cormo.
4. Con ayuda de pinzas estériles colocar el cormo en frascos con el medio de cultivo fresco. Sellar y etiquetar el frasco.
5. Observar cada semana el desarrollo de los cultivos. Anotar los cambios en los cormillos o en el medio. Separar los frascos con cormillos necrosados y contaminados (bacteria u hongo) y registrar.

Los tratamientos con los que se trabajó en el laboratorio se indican en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en la presente investigación.

TRATAMIENTOS				
No	Nº tratamiento	Hormonas		
	Medio MS	BAP (bencilaminopurina)	KIN (kinetina)	ANA (ácido naftalenacetico)
1	T1 MS	1.0	0	0.5
2	T2 MS	0	1	.5
3	T3 MS	0	2	.5
4	T4 MS + Sacarosa	1	0	.5
5	T5 MS + Sacarosa	0	1	.5
6	T6 MS + Sacarosa	0	2	.5

VI.IX. Variables a evaluar

Para cada variable evaluada, se tomarán los datos semanalmente por un periodo de 8 semanas después de la siembra. Las variables evaluadas fueron:

1.- Altura del brote apical (ABA): para cada explante se medirá (cm) con una regla la altura del brote apical.

2.- Altura de brotes laterales (ABL): para cada explante se medirá (cm) con una regla la altura de los brotes laterales.

3.- Número de brotes laterales (NBL): para cada explante se contara el número de brotes laterales.

4.- Tiempo en alcanzar su desarrollo final.

VI.X. Adaptación de plántulas

Para la adaptación de las plántulas de gladiolo obtenidas de cultivo *in vitro* se necesitaron vasos de unicel con perforaciones, bolsas plásticas de 1kg con orificios, ligas, sustrato esterilizado a 120 °C por 20 minutos (agrolita, peat muss en relación 1:1), agua destilada esterilizada, una piseta.

El sustrato se colocó dentro de los vasos y se regaron a capacidad de campo, previamente las plántulas fueron lavadas con agua destilada esterilizada con la finalidad de quitar todo el agar de las raíces, se procedió a realizar el trasplante, se colocó una bolsa plástica con orificios de tal manera que cubriera toda la plántula y esta se sujetó con la liga. Se etiquetó el vaso indicando la fecha de siembra *In vitro* y la fecha de adaptación. Posteriormente los vasos fueron trasladados al invernadero donde se estuvieron regando y observando para detectar alguna anomalía, en este espacio estuvieron 20 días.

VII. Análisis de datos

Los datos obtenidos en cada tratamiento se analizaron bajo un arreglo de parcelas divididas. La parcela grande correspondió a la variedad y los tratamientos correspondieron a la parcela chica. Los datos se transformaron a logaritmo inverso para homogeneizar sus varianzas.

El análisis de varianza se realizó en el programa SAS versión 9.0.

VIII. Resultados y discusión

Al momento de realizar el presente trabajo no se disponen de reportes que indiquen la forma de propagar al gladiolo en cultivo de tejidos en las variedades usadas en México. Sin embargo, existen reportes de las variedades que se utilizan en Pakistan (Memon, 2012), Rumania (Ciuzan *et al.*, 2015), Minnessota, USA (Ascough *et al.*, 2009), Krakow (Kumar *et al.*, 2010), Italia (Remotti *et al.*, 1995), Bangladesh (Shaheenuzzaman *et al.*, 2011).

VIII.I. Tratamiento previo con fungicidas

Los cormillos recibieron un tratamiento previo con diferentes fungicidas (Clorhidrato de oxitetraciclina, Tiofanato metílico, Procloraz, Iprodine, Carboximida) a una dosis de 1g/L para determinar el mejor o los mejores fungicidas para contrarrestar la contaminación de los cormillos, los cuales se pusieron en inmersión por 24 horas posteriormente se dejan secar, para proceder a la propagación artificial.

En el Cuadro 4 se indica la cantidad de frascos con plantas sanas obtenidas por tratamiento por repetición.

Cuadro 4. Numero de frascos de plantas sanas por tratamiento

Numero de cormillos contaminados por tratamiento		
Variedad	Producto/ Repeticion	Contaminacion
Blanca roja	Rovral	
	R1	1
	R2	1
	R3	1
	Sportak	
	R1	1
	R2	0
	R3	0
	Terramicina	
	R1	0
	R2	0
	R3	0
	Captan	
	R1	1
	R2	1
R3	0	
Roja blanca	Pireos	
	R1	0
	R2	0
	R3	0
	Rovral	
	R1	1
	R2	0
	R3	0
	Sportak	
	R1	1
	R2	0
	R3	0
	Terramicina	
	R1	1
	R2	0
R3	0	

	Captan	
R1		1
R2		1
R3		0
	Pireos	
R1		1
R2		0
R3		0

Nota: 1 = a contaminado, 0 = a no contaminado

Se observó que los tratamientos entre fungicidas no existe diferencia numéricas evidentes. Aunque en terminos numéricos se observó una mayor cantidad de frascos con plantas sanas en ,os tratamientos a base de Terramicina y Pireos.

Cuadro 5. Analisis de varianza para la cantidad de frascos con brotes contaminados.

Analisis de varianza		
F:V	DF	F-vValor
Gladiolo	1	0.18 n.s.
Bloque	2	0.18 n.s.
Gladiolo*Bloque	2	4.55 *
Tratamiento	4	2.09 n.s.
Gladiolo*Tratamiento	4	1.55 n.s.
Error	16	
Total	29	
C.V. (%)	75.56	

* Significativo al 0.05%
n.s. = no significativo

En el análisis de varianza indicó que el factor de gladiolo, bloque, tratamiento, así como la interacción gladiolo*tratamiento no existió diferencia estadística; sin embargo la interacción gladiolo*bloque existió diferencia significativa al 0.5%, por lo que se procedió a la separación de medias.

Cuadro 6. Separación de medias para el factor de contaminación por variedad.

Separación de medias para el factor de contaminación por variedad		
VARIEDAD	N	MEDIA
Blancos	15	0.18 a
Rojos	15	0.16 a

No se encontró que el tratamiento de fungicidas tuviera un efecto por variedad, debido a que presentaron los mismos entre las dos variedades utilizadas por tratamiento (Cuadro 6).

En el cuadro 7 se indica el valor medio de frascos con plantas sanas obtenidos por tratamiento.

Cuadro 7. Media de frascos con plantas sanas obtenidos por tratamiento.

Media de cormillos no contaminados obtenidos por tratamiento		
Nº Tratamiento	Producto	Media
T1	Terramicina	0.25 a*
T2	Pireos	0.25 a

T3	Sportak	0.15 a
T4	Rovral	0.10 a
T5	Captan	0.10 a

- Valores en la columna acompañado con la misma letra indican ausencia de diferencia estadística significativa Tukey α 0.05%.

La separación de media indicó que los tratamientos de fungicidas fueron estadísticamente iguales; sin embargo se observó una mayor cantidad de plantas sanas (sin contaminates) en las plantas emitidas de los cormillos tratados con Terramicina y Pireos.

Con los tratamientos que presentaron menor contaminación de cormillos (Terramicina y Pireos) se procedió a realizar los tratamientos a cormillos para la propagación *in vitro*.

VIII.II. Inducción de Brotación

En la Cuadro 8 se muestran los tratamientos para la propagación *In vitro* de dos variedades (borrega roja y blanca), el número de repetición, así como el número de brotes que se obtuvieron en cada tratamiento.

Cuadro 8. Número de brotes obtenidos por tratamiento.

NÚMERO DE BROTES OBTENIDOS EN CADA TRATAMIENTO			
Tratamiento	Repetición	Variedad / N° de brotes	
		BORREGA BLANCA	BORREGA ROJA
T1 MS + 1.0 μ M BAP + .5 μ M ANA	R1	1	1
	R2	1	4
	R3	5	6
	R4	0	2

	R5	4	2
	R1	2	1
	R2	0	3
T2 MS + 1.0 μM KIN + .5 μM ANA	R3	0	2
	R4	2	1
	R5	0	0
	R1	1	0
T3 MS + 2.0 μM KIN + .5 μM ANA	R2	0	1
	R3	0	0
	R4	2	3
	R5	2	2
	R1	0	1
	R2	3	4
T4 MS + sacarosa + 1.0 μM BAP + .5 μM ANA	R3	2	3
	R4	4	2
	R5	1	5
	R1	0	2
	R2	1	0
T5 MS + sacarosa + 1.0 μM KIN + .5 μM ANA	R3	0	1
	R4	3	0
	R5	4	1
	R1	0	1
	R2	1	1
T6 MS + sacarosa + 2.0 μM KIN+ .5 μM ANA	R3	1	0
	R4	1	0
	R5	0	2

Cuadro 9. Separacion de medias para el factor de brotación por variedad

Separacion de medias por variedades		
VARIEDAD	N	MEDIA
Blancos	30	1.70 a
Rojos	30	1.36 a

La separación de medias para el factor de brotación por variedad indicó que no existe diferencia entre las variedades de gladiolo rojos y blancos.

VIII.III. Media del número de brotes obtenidos por tratamiento

Respecto al número de brotes obtenidos por tratamientos en el siguiente cuadro se muestra la varianza para el número de brotes obtenidos.

Cuadro 10. Análisis de varianza de número de brotes emitidos por cormillo.

Análisis de varianza		
F:V	GL	F-vValor
Gladiolo	1	0.81 n.s.
Bloque	4	0.99 n.s.
Gladiolo*Bloque	4	0.67 n.s.
Tratamiento	5	3.17 *
Gladiolo*Tratamiento	5	0.50 n.s.
Error	40	
Total	59	
C.V. (%)	93.37	

* Significativo al 0.05%

n.s. = no significativo

En el análisis de varianza indicó que el factor de gladiolo, bloque, así como la interacción gladiolo*bloque y gladiolo*tratamiento no existió diferencia

estadística; sin embargo el factor tratamiento existió diferencia significativa al 0.5%, por lo que se procedió a la separación de medias.

En el cuadro 11 se muestra la media del número de brotes obtenidos por tratamiento.

Cuadro 11. Media del número de brotes obtenidos por tratamiento

Media del numero de brotes obtenidos por tratamiento	
Tratamiento	Media
T1 MS + 1.0 μ M BAP + .5 μ M ANA	2.60 a
T2 MS + 1.0 μ M KIN + .5 μ M ANA	1.1000 b
T3 MS + 2.0 μ M KIN + .5 μ M ANA	1.1000 b
T4 MS + sacarosa + 1.0 μ M BAP + .5 μ M ANA	2.5000 a
T5 MS + sacarosa + 1.0 μ M KIN + .5 μ M ANA	1.200 b
T6 MS + sacarosa + 2.0 μ M KIN+ .5 μ M ANA	.7000 b

Nota: BAP (Bencilaminopurina), KIN (Kinetina), ANA (acido naftalenacetico).

- Valores en la columna acompañado con la misma letra indican ausencia de diferencia estadística significativa Tukey α 0.05%.
-

La separación de media indicó que los tratamientos T2, T3, T5, T6 fueron estadísticamente iguales; sin embargo en los tratamientos 1 y 4 presentaron el mayor numero de brotes y fueron estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos; en este sentido Ramirez-Hernandez (2013) obtuvo brotes utilizando

el medio MS adicionado con 1.0 μM de bencilaminopurina en combinación con 0.5 μM de ácido naftalenacético. De igual manera Bruyn y Ferreira (1992) reporta la obtención de brotes utilizando el medio MS suplementado con sacarosa 3% y adicionado con 1.0 μM bencilaminopurina.

IX. Conclusiones

- La mayor formación de brotes por cormillo se obtuvo en medio MS suplementado con 1.0 μM de bencilaminopurina en combinación con .5 μM ácido naftalenacético y MS suplementado con sacarosa mas 1.0 μM bencilaminopurina en combinación con .5 μM ácido naftalenacético.
- En la etapa de adaptación los brotes enraizados lograron una supervivencia del 100% en condiciones bajo invernadero.
- Los mejores tratamientos previos con fungicidas para la obtención de plántulas sanas fueron Pireos y Terramicina a una dosis de 1g/L en inmersión por 24 horas.

X. Producto entregable

PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *In vitro* DE GLADIOLO

INTRODUCCIÓN

En el sistema de producción de gladiolo existe la necesidad de disponer semilla asexual sana y en buena condición física. La propagación *In vitro* es una alternativa viable que nos permite disponer de semilla sana. El uso de cormos en plantas bulbosas bajo la técnica de micro propagación es una gran ventaja en comparación con la propagación convencional, debido a que por medio de las técnicas de reproducción *In vitro* se puede obtener material con óptimas condiciones fitosanitarias en menor tiempo, otra de las ventajas es el aumento masivo de la producción mediante el manejo de las hormonas de crecimiento como la Bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (ANA), Kinetina (Kin), así como manejar los ciclos de multiplicación *in vitro* con la finalidad de una multiplicación masiva en un corto tiempo (Faheem et al. 2008, citado por María Ordoñez Vargas, 2010).

OBJETIVO

Generar la metodología para la propagación *In vitro* de gladiolo a partir de cormillos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Cultivares de dominio publico de la variedad blanca y roja borrega.
- Medio MS adicionado con sacarosa 30 g/L.
- Hormonas: bencilaminopurina, ácido indolacético, kinetina.
- El material vegetativo a utilizar deberá estar lo más sano posible.

Metodología

Tratamiento previo

Los cormillos se tratan previamente para su desinfección con terramicina agrícola (Clorhidrato de oxitetraciclina al 5%) y/o pireos (Tiofanato metílico al 70%) en una concentración de 1 g/L, en inmersión durante 24 horas, después se dejan secar a la sombra para proceder a la propagación en medio artificial.

Posteriormente en el laboratorio se procede a lo siguiente:

- Elaboración del medio de cultivo MS enriquecido con sacarosa más las hormonas bencilaminopurina a una concentración de 1 μ M + ácido indolacético a una concentración de 0.5 μ M.
- Esterilizar en la autoclave a 120 °C por 20 minutos.
- Una vez esterilizado, se vacía en frascos gerber a cada uno se le colocan 20 ml, se deja solidificar el medio.
- Antes de realizar la siembra de los cormillos en el medio de cultivo, estos llevan un proceso de desinfección que consiste en:
 - Lavar los cormillos con agua jabonosa. [SEP]
 - Sumergirlos en etanol al 70% durante 1 minuto. [SEP]
 - Los cormillos se colocan en inmersión con hipoclorito de sodio al 1.0% durante 15 minutos.
 - Posteriormente pasan a una solución de agua destilada estéril con gentamicina a una concentración de 5mg/L (200 micro litros por 100 mL) durante 10 minutos.
 - Los cormillos se colocan en inmersión con microdin (3 gotas por frasco) durante 15 minutos, a partir de este momento trabajar en la cámara de flujo laminar posteriormente se enjuaga el material vegetal tres veces con agua destilada esterilizada.
- Los cormillos se siembran en frascos con medio de cultivo MS enriquecido con sacarosa más las hormonas bencilaminopurina a una concentración de 1 μ M + ácido indolacético a una concentración de 0.5 μ M.
- Los cormillos se incuban a un fotoperíodo de 16 horas luz, por 8 horas de oscuridad, a temperatura de 24 °C.
- Observar el desarrollo y eliminar las que presenten contaminación bacteriana o fúngica.

XI. Bibliografía

Anónimo. 2010. Cultivo de Gladiolo. Proyecto Estratégico para la Seguridad Alimentaria Unidad Técnica Nacional. Región Altos de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 36 p.

Buschman JCM. 1984. Gladiolus as cutflower in subtropical and tropical regions. International Flower Bulb Centre. Holland. 31 p.

Chahín MGA, Montesinos AV, Márquez FJ, Ferrada SN y Ibáñez ML. 2007. Manual de Producción de flores cortadas – IX Región. Dirigido a pequeños productores de la agricultura familiar campesina. Fundación para la Innovación Agraria– Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chile. pp. 44-47.

Chandel, R., and R. Deepika. 2010. Recent advances in management and control of Fusarium yellows in Gladiolus species. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 18: 361-380.

Chawla, HS. 2007. Introduction to plant biotechnology: micropropagation. 2 ed. United States of America, Pantanargar, India. p 39-56.

Consultado el 30 de mayo de 2018.

Dantu, P. K., and S. S Bhojwani. 1987. In vitro propagation and corm formation in *Gladiolus*. *Gartenbauwissenschaft*. 52: 90-93.

Dole, JM; Wilkins, HF. 2004. Floriculture: principles and species; *Gladiolus*. 2 ed. Upper Sadle River, New Jersey. Pearson Education. p 552-556.

Faheem, A; Memoona, A; Humera, A. In vitro shoot multiplication and callus induction in *Gladiolus Hybridus* horst (en línea). *Bot J. Department of botany, University of the Punjab, Q. A. Campus, Lahore*. Publicado el 7 de Octubre 2007. Consultado el 15 de agosto del 2010. Disponible en: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40\(2\)/PJB40\(2\)517.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40(2)/PJB40(2)517.pdf)

García-López M, Gómez-Aguilar JR, Robles-Bermúdez A, Díaz-Heredia M y García- Vivanco RA. 2012. Efecto de la poda foliar postcosecha, en la producción de cormo de gladiolo *Revista Fuente Nueva Época* 4:1-8.

García-Quintero T. 2014. Efecto de la aplicación en campo de agentes naturales sobre la incidencia de la fusariosis en plantas, cormos y la calidad postcosecha del gladiolo. Tesis de Maestría. Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi. Maestría en Ciencias ^[L]_[SEP] en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Yautepec, Mor.

Gutiérrez, T. 2010. Cultivo de gladiolo: descripción de cormo 8 (en línea). Chiapas,

México, proyecto estratégico para la seguridad alimentaria. Unidad Técnica Nacional. Publicado en marzo del 2010. Consultado 3 de agosto del 2010. Disponible en: http://www.utn.org.mx/docs_pdf/novedades/LECTURA_MANUAL_FLORICULTURA_CULTIVO_DE_GLADIOLO.pdf

Hartmann, H. T., D. E. Kester, and F. T. Davies. 1990. Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA. 647 p.

Hidroponia, (2018). Cual es la situación de la floricultura en México. Disponible en: <http://hidroponia.mx/cual-es-la-situacion-de-la-floricultura-en-mexico/>. Consultado el 30 de mayo de 2018.

Hidroponia, (2018). La floricultura en México un desarrollo potencial para la economía. Disponible en: <http://hidroponia.mx/hidroponia.mx/la-floricultura-en-mexico-un-desarrollo-potencial-para-la-economia/>. Consultado el 29 de mayo de 2018.

IFBC. International Flower Bulb Centre. 2012. Gladiolus as cut flowers. Guidelines for cut flower production. <http://edepot.wur.nl/167428> ó <http://www.bulbsonline.org> (consulta, julio 2013).

INFOAGRO, (2018). El cultivo del gladiolo. Sistema de Información del Sector Agropecuario Costarricense. Disponible en: <http://www.infoagro.com/flores/flores/gladiolo2.htm>. Consultado el 30 de mayo de 2018.

- ININ, (2018). Funcionamiento de la Planta de Irradiación Gamma del ININ. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares._Disponible en: <http://inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/Funcionamiento.pdf>.
- Kumar, A., Sood, A. Palni, L. M. S. and A. K. Gupta. 1999. In vitro propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 105-112.
- Leszczyńska de Borys H y Borys MW. 1994. *Gladiola. Producción, cultivo y desarrollo*. Edamex, S. A. de C. V. UPAEP. 166 p.
- Lindsey, K., and M. G. K. Jones. 1992. *Biología Vegetal Agrícola*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 276 p.
- Miller, C. O., F. Skoog, F. S. Okumura, M. H. Von Saltza, and F. M. Strong. 1955. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal American Chemistry Society* 78: 1375–1380.
- Ochoa, A. N. 1990. Establecimiento de cultivos in vitro. En fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. *Boletín, FAO*. pp: 23-27.
- Razdan, M. K. 2003. *Introduction to plant tissue culture*. Science publishers. New Hampshire, USA. 359 p.
- Rees, A. R. 1993. *Ornamental Bulbs, Corms and Tubers*. CAB International. Wallingford, UK. 220 p.
- Rojas GS, García LJ y Alarcón RM. 2004. *Propagación asexual de plantas. Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas*. Ministerio de

- Agricultura y Desarrollo Rural. CORPOICA. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología, Pronatta. Colombia. 56p.
- SIAP. 2018. Anuario el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, ciclos 2002. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Consultado el 30 de mayo de 2018.
- Simonsen, J., and A. C. Hildebrandt. 1971. In vitro growth and differentiation of Gladiolus plants from callus cultivars. Canadian Journal of Botany 49:1817-1819.
- Steinitz, B., A. Cohen, Z. Goldberg, and M. Kochba. 1991. Precocious gladiolus corm formation in liquid shake cultures. Plant Cell Tissue Organic Culture 26:63-70.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. Plant Physiology. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 764 p.
- Universidad Tecnológica de Nezahualcóyotl, (2010), Cultivo de Gladiolo. Proyecto Estratégico para la Seguridad Alimentaria, Unidad Técnica Nacional. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Villalobos, A. V. 1990. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En Fundamentos teóricos- prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Boletín FAO. pp:3-7.

- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1932. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp: 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, California, USA. 482 p.
- Ziv, M., A. H. Halevy, and R. Shillo. 1970. Organs and plantlet regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. *Annual Botany* 34: 611-676.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Ziv, M. 1979. Transplanting gladiolus plants propagated in vitro. *Scientia Horticulturae* 11: 257-260.
- Bajaj, Y. P. S., M. M. S. Sidhu, and Gill, A. P S. 1983. Some factoring affecting the in vitro propagation of gladiolus. *Scientia Horticulturae* 18: 269-275.
- El-Rahman, A., E. Awad, and El-Hamied, A. A. 1985. Anatomical study on gladiolus stem apex as affected by kinetin, geberellin, ethephon concentration and irradiation doses. *Acta Horticulturae* 167: 177-185.
- Ziv, M. 1989. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell Tissue. Organic Culture*. 17: 101-110.
- Leszczyńska, B. H., y Borys W. M. 1994. *Gladiolo*. Ed. EDAMEX. México Distrito Federal. México. 61 p. 

Landeras G, Pascualena J y Ortiz-Barredo A. 2003. Producción de cormos de gladiolo en Alava: estudio preliminar. X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Actas de Horticultura N° 39: 514- 515.

Ordoñez, V. M. 2010. Establecimiento in vitro de *Gladiolus* sp. a partir de cormillos. Zamorano, Honduras. 29 p.

González-Pérez E. 2011. Fenología, propagación In vitro y enfermedades del gladiolo en San Martín Texmelucan, Puebla. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Producción de Semillas. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Gutiérrez Gómez Nereyda .A. 2013. "Evaluación de cuatro variedades de cultivo de Gladiolo *Gladiolus* spp. (Asparagales; Iridiceae), bajo invernadero, San Francisco El Alto, Totonicapán". Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Campus de Quetzaltenango.

Vidalie H. 2001. Producción de flores y plantas ornamentales. 3a Edición. Mundi-Prensa, S. A de C. V. España. 269 p.

<http://www.revistafuente.com.mx/index.php/numero4-11> (consulta, septiembre 2013).