

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AZÚCAR EN EL ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE GLADIOLA (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) cv AMSTERDAM

EFFECT OF CONCENTRATION OF GROWTH REGULATORS AND SUGAR IN THE *in vitro* ESTABLISHMENT OF GLADIOLA (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) cv AMSTERDAM

**José Antonio Chávez-García¹, Carlos Manuel Acosta-Durán^{2*},
María Claudia Rueda-Barrientos¹, Luis Granada-Carreto²,
Ricardo Antonio Flores-Olascoaga³, José Merced Mejía-Muñoz⁴**

¹Estudiante de posgrado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.

²Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM. Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México.

³Laboratorio de Micropropagación, Centro de Desarrollo Tecnológico FIRA Tezoyuca, Morelos, México.

⁴Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México.

*Autor para correspondencia. Correo-e: acosta_duran@yahoo.com.mx

RESUMEN

La propagación *in vitro* es una alternativa para especies productoras de cormo, especialmente cultivares híbridos de gladiola porque aumenta las tasas de multiplicación y genera material libre de virus y otros patógenos. Los reguladores de crecimiento y las concentraciones de azúcar en el medio de cultivo determinan el desarrollo de explantes de gladiola con fines de micro propagación, por lo anterior, se realizó un estudio con el objetivo de determinar la concentración óptima de reguladores de crecimiento y azúcar en

etapa 1 de la propagación *in vitro* de explantes a partir de ápices y meristemas de gladiola cv. Amsterdam. Las principales conclusiones fueron: El manejo de planta original permite realizar una segunda selección de cormos con brotes que visualmente no presentan contaminación por hongos, bacterias y virus; Los brotes jóvenes facilitan su manipulación para aislar el ápice y el meristemo, obteniendo explantes que logran soportar las condiciones *in vitro*; El ápice responde mejor a las condiciones *in vitro* e inician más rápido su desarrollo que el meristemo; Cuando hay organogénesis, la concentración de 4% de azúcar en el medio

de cultivo supera significativamente a la concentración de 3% en el desarrollo; El efecto de BA y ANA sobre ápices y meristemas dieron como respuesta formación de callo en el 100% de los explantes; En un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento los explantes a partir de ápice y meristemo desarrollan órganos directamente. El presente estudio describe un proceso eficaz para la etapa de establecimiento del cultivo aséptico de gladiola cv Amsterdam.

Palabras clave: *Gladiolus grandiflorus*, explantes, micropropagación, reguladores de crecimiento, sacarosa.

ABSTRACT

The propagation *in vitro* is an alternative to producing species with corm, especially hybrid cultivars of gladiolus because it increases the rates of multiplication and generate material free of viruses and other pathogens. Growth regulators and sugar concentrations in the culture medium determine the development of explants of gladiolus with purpose of micropropagation, from the above, a study to determine the optimal concentration of growth regulators and sugar for stage one of the *in vitro* propagation of explants from apices and meristems of gladiolus cv. Amsterdam, was conducted. The main conclusions were: management of original plant allows a second visual selection of corms with outbreaks that no shows contamination by fungi, bacteria and viruses; young shoots facilitate handling and to isolate the apex meristem, explants obtained withstand achieved *in vitro* conditions; The apex responds to conditions *in vitro* and initiate faster development than the meristem does; when there is organogenesis, the 4% of sugar concentration in the culture

medium, significantly exceeds to 3% concentration for plant development; The effect of BA and NAA on apices and meristems, giving callus formation response in 100% of the explants; In a culture medium without growth regulators, the explants from apex meristem develops organs directly. The present study describes an effective step of establishment of aseptic culture of gladiolus cv Amsterdam process.

Keywords: *Gladiolus grandiflorus*, explants, micro propagation, growth regulators, sucrose.

INTRODUCCIÓN

Las plantas ornamentales están entre las especies agrícolas con el mayor valor de la producción por hectárea y producen una derrama económica importante, debido a la inversión en infraestructura, insumos y mano de obra necesaria para su cultivo (González-Pérez, 2013). En particular, la gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tiene gran potencial como flor de corte y es cultivada en todo el mundo por su elegante y atractiva espiga de diferentes matices y buena calidad de conservación. Holanda y otros países de Europa, así como Brasil y México en América son productores de flor de gladiola para exportación (Chandel y Deepika, 2010). En México, esta especie ocupa el tercer lugar en importancia, con 2 200 ha sembradas, después de la rosa y el crisantemo. Los principales estados productores son: Puebla, Estado de México, Michoacán, Morelos y Veracruz (SIAP, 2010).

La propagación convencional de gladiola en el campo hoy en día se ha enfrentado a algunos problemas debido al lento crecimiento y baja tasa de multiplicación, además de ataques de enfermedades en el cormo. La gladiola por lo general se propaga utilizando cormos que se formaron como hijos del cormo primario y que se denominan "cormillos". Estos cormillos no son viables para producir flor al

siguiente ciclo. El cormillo debe plantarse aproximadamente de 3 a 4 ciclos para que alcance el tamaño adecuado para una floración comercial. Estas bajas tasas de propagación obstaculizan la introducción de nuevas variedades o materiales libres de virus (Budiarto, 2009), Las técnicas *in vitro* son útiles para la propagación de las especies productoras de cormo, especialmente cuando los cultivares híbridos de gladiola tienen baja tasa de multiplicación. La propagación *in vitro* es una alternativa a los métodos convencionales; que aumenta las tasas de multiplicación y también generan material libre de virus y otros patógenos (Memon et al., 2012).

El cultivo de tejidos ofrece el potencial para producir grandes cantidades de plantas sanas y en forma constante en un tiempo relativamente corto, además de mantener la fidelidad genética (Haouala y Salhi, 2012). Se reportan también estudios para producir materiales de siembra de alta calidad a través de reproducción de gladiola *in vitro* a partir de cormos (Dharmasena et al., 2011). Se han producido brotes a partir de cormos, meristemos y hojas como explantes, donde se han comparado la respuesta de inducción de callo y brotes directos en diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (Priyakumari y Sheela, 2005) La regeneración directa o indirecta *in vitro* del gladiolo a través de diferentes tipos de explantes depende del genotipo de la planta y la elección de reguladores de crecimiento. KIN, BAP y ANA son los más importantes reguladores de crecimiento que por sí solos o en combinación tienen un efecto en la reproducción de plántulas de gladiolo (Memon et al., 2012). La sacarosa es el azúcar más utilizada en los medios de cultivo. Kumar et al. (1999) investigaron el efecto de la concentración de sacarosa en relación al choque térmico en la morfogénesis con el fin de lograr una mayor tasa de multiplicación para la propagación a gran escala de gladiola. La presencia de azúcar en el medio nutritivo, es esencial para el desarrollo de una planta *in vitro* debido a

que la fotosíntesis en estas condiciones de cultivo, suele ser insuficiente para satisfacer la demanda de carbono por la planta. Esto, se relaciona a que los tejidos verdes *in vitro* no son suficientemente autotróficos, y que la concentración de CO₂ en la atmósfera del tubo de cultivo no es siempre la más adecuada y con una iluminación insuficiente. En consecuencia, la planta *in vitro* necesita tomar carbono del medio de cultivo para satisfacer sus necesidades.

En la actualidad, la mayoría de los investigadores coinciden en afirmar que se pueden diferenciar cinco fases o etapas del cultivo *in vitro*, para lograr una exitosa multiplicación (Orellana, 1998; Jiménez, 1998; Agramonte et al., 1998).

Fase 0 o Preparativa: Consiste en la selección de la planta donadora y una serie de pre-tratamientos en condiciones higiénicas controladas con el objetivo de mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos en condiciones *in vitro*.

Fase I o de Establecimiento: Su propósito general es lograr un cultivo aséptico y viable. A su vez consta de varios pasos, como son la selección del explante, la desinfección, la elección de los medios de cultivo y las hormonas del crecimiento a emplear en estos.

Fase II o de Multiplicación: Se realiza con el objetivo de lograr la proliferación de los explantes, sin perder de vista la conservación de la estabilidad genética.

Fase III o de Enraizamiento: Fase de inducción, elongación y desarrollo de raíces de cada uno de los propágulos que se han formado durante la fase anterior.

Fase IV o de Aclimatización: Las condiciones del cultivo *in vitro* provocan determinados cambios morfológicos y fisiológicos en las plantas, por lo que se hace necesario garantizar un retorno gradual de estas a sus características normales para

que sobrevivan el trasplante a las condiciones ambientales.

Por lo anterior se realizó un experimento con el objetivo de determinar la concentración óptima de reguladores de crecimiento y azúcar en etapa 1 de la propagación *in vitro* de explantes a partir de ápices y meristemos de gladiola cv. Amsterdam.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de micro propagación del Centro de Desarrollo Tecnológico de Tezoyuca, FIRA. Se utilizaron cormos de gladiola variedad Amsterdam colectados al azar de un lote destinado a la producción de flor de corte en la zona poniente del Estado de Morelos, México.

El manejo de planta original que corresponde a la etapa 0 del cultivo *in vitro*, consistió en:

1. Limpiar el cormo quitándole las hojas que lo envuelven,
2. Tratamiento del cormo: Primero se realizó una inmersión por 30 minutos con Busan 30W® (TCMTB: tiocianometiltio benzotiazol) a una dosis de 1 ml/litro de agua, después se vuelven a sumergir durante 30 minutos en una solución de Sportak® (Procloraz) a una dosis de 1 ml/litro de agua.
3. Siembra de cormo: En macetas de 6 pulgadas conteniendo tepojal como sustrato con una granulometría de menos de 5 mm. Se colocaron 4 cormos ligeramente enterrados dejando expuesto la mayor parte del cormo con las yemas hacia arriba. Se regó una vez por día, hasta que los brotes del cormo tuvieron 25 días.

Para la etapa 1: Establecimiento de Cultivo Aséptico. Se realizaron las siguientes actividades:

1. Limpieza de la fuente del explante. Se extrajeron las plantas con raíz de las

macetas y se lavaron con suficiente agua para retirar los restos de sustrato.

2. Obtención de explante. Se hicieron cortes del cormo y las hojas para formar la base del explante de aproximadamente 5-7 mm de ancho por 15-20 mm de alto.

3. Pre desinfección. Los explantes fueron expuestos por inmersión en una solución con 0.5 ml de Agrimec® (Abamectina) por litro de agua desmineralizada durante dos minutos, inmediatamente después los explantes se sumergieron durante cinco minutos en una solución con agua desmineralizada al 3% de cloro más 0.5 g/litro de detergente, se mantuvo en agitación constante.

4. Desinfección de explantes. En la cámara de flujo laminar se expusieron los explantes a una solución desinfectante con 10% de cloro y agua desmineralizada estéril durante 18 minutos.

5. Obtención de ápice y meristemos. En la cámara de flujo laminar, con un microscopio estereoscópico, un mango para bisturí del no. 3 con navaja del no. 12, y pinzas de disección curvadas tipo bayonet (20 cm de longitud). Se realizó la disección del explante hasta aislar el ápice y el meristemo, con la menor porción de base necesaria.

6. Siembra de ápice y meristemo. Se toma el ápice con la punta de la navaja y se siembra en el medio de cultivo contenido en un tubo de ensaye.

Medios de cultivo y condiciones del experimento

El medio de cultivo fue el de Murashige and Skoog (MS) (1962), suplementado con 1 mg/l de vitaminas más 120 mg/l de Inositol, más 7.5 g/l de agar, con un pH ajustado a 5.7.

El experimento se realizó con un diseño completamente al azar, con arreglo factorial con 5 repeticiones. La unidad experimental la compone un tubo de ensayo. El tipo de explante es el factor A (2 niveles), la concentración de azúcar es el factor B (2 niveles) y la relación de reguladores de crecimiento (BA: ANA) es el factor C (4 niveles). Lo que generó 16 tratamientos que se muestran en el Cuadro 1.

A los 30 días después del establecimiento de los explantes, se tomaron datos no destructivos de:

Sobrevivencia (Conteo de las unidades experimentales con los explantes vivos), número de brotes (Conteo de todos los brotes formados en cada unidad experimental), tamaño de brote (Medición sobre una hoja milimétrica la longitud del brote principal), tamaño de raíz (Medición sobre una hoja milimétrica la longitud de la raíz principal) y tamaño de callo (Medición sobre una hoja milimétrica el tamaño del callo).

Para el análisis de los datos se utilizó el programa SAS y la prueba de comparación múltiple de medias (DMS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El manejo de planta original muestra resultados favorables, al utilizar esta técnica de inducción de desarrollo vegetativo en cormos en estado de dormancia. Permite realizar una segunda selección de cormos con brotes que visualmente no presentan contaminación por hongos, bacterias y virus. Además los brotes jóvenes facilitan su manipulación para aislar el ápice y el meristemo. Las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes (Calva, 2005). La pre desinfección y desinfección del explante permitió de manera favorable contar con las unidades experimentales para montar el experimento.

El porcentaje de sobrevivencia (Figura 1) se evaluó con las observaciones tomadas a los 30 días después del establecimiento, los datos muestran que los explantes de ápice tienen mayor porcentaje de sobrevivencia que los explantes de meristemas, y el tratamiento con mayor

porcentaje de sobrevivencia es el T2. George *et al.* (2008), escriben que explantes más grandes tienen mayor posibilidad de sobrevivir a las condiciones *in vitro*, inician más rápido su desarrollo y tienen mayor número de yemas axilares.

Respuesta en el establecimiento *in vitro* de gladiola cv Amsterdam

Los resultados mostraron diferencias significativas en todas las variables observadas como efecto de los diferentes tratamientos aplicados (Cuadros 2 y 3).

Los resultados del efecto de los reguladores de crecimiento sobre ápices y meristemas dieron como respuesta formación de callo, 100% en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento y 0% en los tratamientos sin reguladores de crecimiento, donde hubo formación de órganos. Jiménez (1998) menciona que usualmente en los meristemas y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis es la raíz, por lo que la adición exógena de citoquinina en los medios de establecimiento es generalizada y cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio aunque estas pueden estimular el crecimiento, pero en los meristemas de 0,5 mm o menos y en yemas en reposo es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria su adición exógena en estos casos.

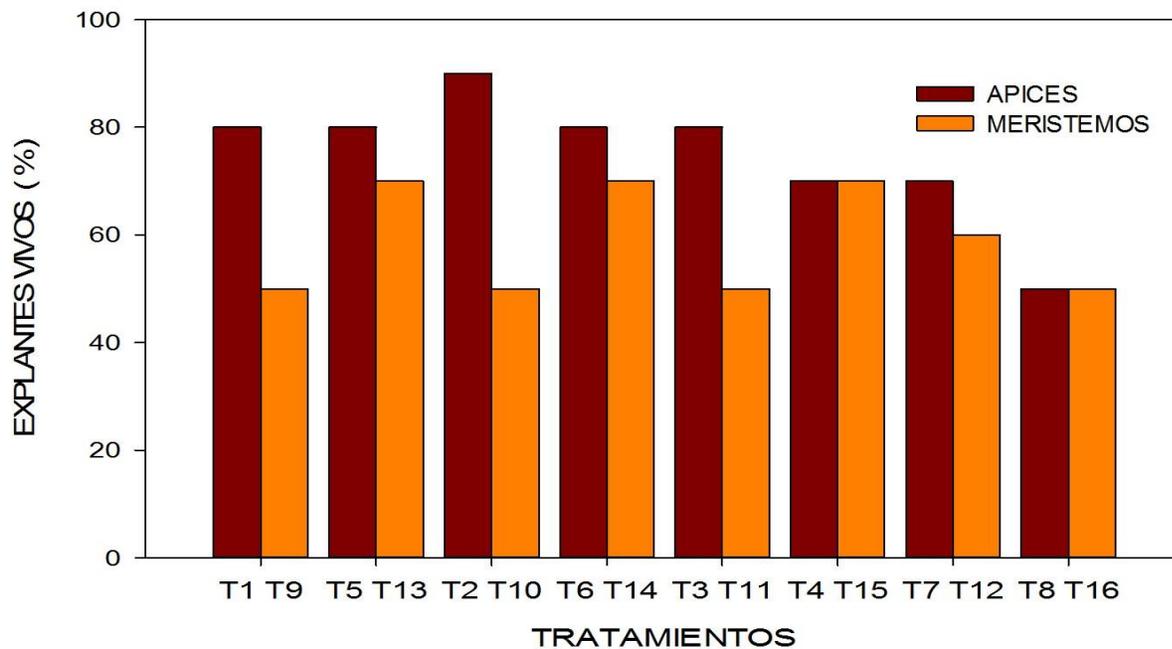
Formación de órganos

Número de brotes.

Para el factor explante los promedios de número de brotes registraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre ápice y meristemo. En explantes de ápice, se presentó mayor número de brotes superando en un 36% a los explantes de meristemo (Cuadro 2).

Cuadro 1. Tratamientos para el experimento de explantes, concentración de azúcar y relación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de gladiola.

Tratamiento	Explante	Azúcar	Relación de RC
T1	Ápice	3 % azúcar	0.0 (BA):0.0 (ANA)
T2			1.0 (BA):0.5 (ANA)
T3			1.0 (BA):1.0 (ANA)
T4			1.0 (BA):1.5 (ANA)
T5		4 % azúcar	0.0 (BA):0.0 (ANA)
T6			1.0 (BA):0.5 (ANA)
T7			1.0 (BA):1.0 (ANA)
T8			1.0 (BA):1.5 (ANA)
T9	Meristemo	3 % azúcar	0.0 (BA):0.0 (ANA)
T10			1.0 (BA):0.5 (ANA)
T11			1.0 (BA):1.0 (ANA)
T12			1.0 (BA):1.5 (ANA)
T13		4 % azúcar	0.0 (BA):0.0 (ANA)
T14			1.0 (BA):0.5 (ANA)
T15			1.0 (BA):1.0 (ANA)
T16			1.0 (BA):1.5 (ANA)

Figura 1. Porcentajes de sobrevivencia a los 30 días después de haberse establecido el cultivo *in vitro* de ápices y meristemos de gladiola cv Amsterdam.

En el caso del porcentaje de azúcar los promedios registraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre 3% y 4% de azúcar en el medio de cultivo. El uso de 4 % aumenta la brotación en un 25% con respecto a la concentración de 3% de azúcar (Cuadro 2).

Los resultados mostraron que solo los tratamientos sin reguladores de crecimiento (T1, T5, T9, T13) desarrollaron brotes directos (Cuadro 2). El mejor tratamiento registrado es la combinación de ápice y 4 % de azúcar (Figura 2-A). Ramírez-Hernández (2013) reporta como mejor respuesta de inducción de brotes en explantes de cormos, la relación de 1 mg l⁻¹ de BA y 0.5 mg l⁻¹ de ANA, por lo que se

esperaba un comportamiento similar, sin embargo al utilizar las concentraciones de reguladores de crecimiento en ápices y meristemas no hay organogénesis directa, sino formación de callo. Goo *et al.* (2003) reportan la formación efectiva de órganos con 1 mg l⁻¹ de BA y 0 mg l⁻¹ de ANA. Budiarto (2009) utilizó cormillos como explantes y un medio MS suplementado con 0.5 mg l⁻¹ de ANA con varias concentraciones de BA (1, 2, 3, 4 mg l⁻¹) para determinar la concentración óptima para inducción de brotes, encontrando 2 mg l⁻¹ como nivel óptimo. De Bruyn y Ferreira (1992) utilizando cormillos como explantes reportaron la mejor producción de brotes por explante en un medio MS con 1.0 a 2.0 mg l⁻¹ de BA con 3 % de sacarosa.

Cuadro 2. Tratamientos para el experimento de explantes, concentración de azúcar y relación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de gladiola.

Explante	% de Azúcar	Reguladores de Crecimiento (BA:ANA)	Tratamiento	Número de brotes	Tamaño de brotes (mm)	Tamaño de raíz (mm)	Tamaño de callo (mm)
Ápice	3	0.0:0.0	T1	1.4 b	102.8 b	73.2 b	0.0 h
	3	1.0:0.5	T2				8.4 ab
	3	1.0:1.0	T3				7.2 bcde
	3	1.0:1.5	T4				6.6 cdef
	4	0.0:0.0	T5	2.0 a	130.0 a	88.2 a	0.0 h
	4	1.0:0.5	T6				7.6 bcd
	4	1.0:1.0	T7				7.7 bc
	4	1.0:1.5	T8				9.4 a
Meristemo	3	0.0:0.0	T9	1.0 b	6.0 d	3.6 c	0.0 h
	3	1.0:0.5	T10				5.2 fg
	3	1.0:1.0	T11				5.8 efg
	3	1.0:1.5	T12				5.4 fg
	4	0.0:0.0	T13	1.2 b	16.2 c	6.2 c	0.0 h
	4	1.0:0.5	T14				6.0 defg
	4	1.0:1.0	T15				5.8 efg
	4	1.0:1.5	T16				4.6 g
CV				25.25	6.48	5.71	22.68
DMS				0.474	5.54	3.27	1.918

En las columnas, letras iguales indican sin diferencia significativa ($p < 0.05$).
CV: coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa.

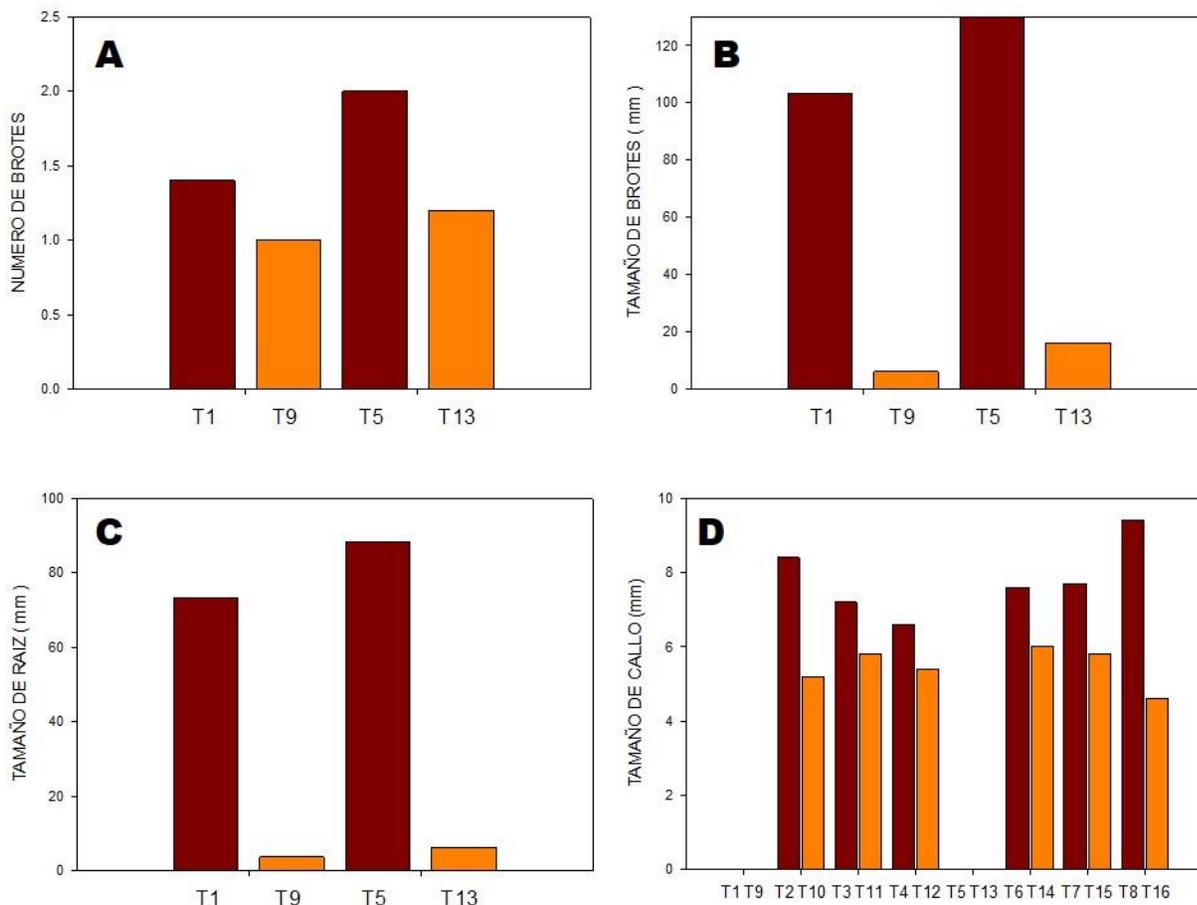


Figura 2. Respuesta de los tratamientos para el experimento de explantes, concentración de azúcar y relación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de gladiola.

Tamaño de brote

En explantes se observaron diferencias estadísticas significativa ($P \leq 0.05$) entre ápices y meristemas. El mayor tamaño de brote se registró en ápice con 10.5 veces más que en meristemo. En los porcentajes de azúcar utilizados la concentración de 4% tiene diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) mayor que la concentración de 3%. Es evidente que la mejor combinación de explante y azúcar es el tratamiento T5 (Cuadro 2, Figura 2-B). El tamaño del explante y el azúcar son factores importantes en el desarrollo de los brotes.

Tamaño de raíz

Se tuvieron diferencias estadísticas significativas en los factores explantes y azúcar ($P < 0.05$). Se registra 16 veces más tamaño en raíz por el tipo de explante y 1.2 veces más por el azúcar, el ápice desarrolló más que el meristemo y la concentración de 4% de azúcar afectó positivamente el enraizamiento (Cuadro 3), el tratamiento que presentó mejor desarrollo de raíz fue el T5 con 4% de azúcar (Cuadro 2, Figura 2-C). Es importante considerar que la sacarosa además de actuar como carbohidrato funciona como potenciador osmótico, lo que muchas veces afecta el enraizamiento

(George et al., 2007). Varios trabajos se han realizado sobre gladiola donde los porcentajes más utilizados son 3% y 4% de azúcar (Aftab et al., 2008; Dharmasena et al., 2011; González-Pérez, 2013; Goo et al., 2003; Torabi y Hajieghrari, 2008; Haouala y Salhi, 2012; Jala, 2013; Memon et al., 2014).

Tamaño de callo

El callo se inició después de tres semanas de establecido el explante. Se evaluaron estadísticamente cada uno de los factores y sus combinaciones. Los resultados para inducción de callo registraron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en el factor explante, el valor más alto de tamaño de callo es 1.4 veces más que el de meristemo. Para el factor azúcar no se presentan diferencias estadísticas significativas. Para las diferentes relaciones de BA y ANA no hubo diferencias estadísticas significativas. Las combinaciones de explante-azúcar (EA), explantes-reguladores de crecimiento (ERC), azúcar-reguladores de crecimiento (Cuadro 2) no presentan diferencias significativas para esta variable. El tratamiento con el promedio más alto en tamaño de callo es el T8 (Cuadro 2, Figura 2-D).

En plantas monocotiledóneas bulbosas, el callo se induce generalmente de tejidos meristemáticos tales como ápices y meristemas, varias investigaciones reportan que la inducción de callo ocurre en presencia de ANA (Memon et al., 2012). En otro estudio realizado por Emek y Erdag (2007) utilizando secciones de cormo como explante en un medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ANA y sin reguladores de crecimiento, obtuvieron el registro más

alto en formación de callo (75%) en un medio MS con 8.5 mg l⁻¹ de ANA. Goo et al. (2003) determinaron que la mejor inducción de callo a partir de ápices de gladiola fue en un medio MS suplementado con 1.0 a 10 mg l⁻¹ de ANA.

CONCLUSIONES

El manejo de planta original muestra resultados favorables, permite realizar una segunda selección de cormos con brotes que visualmente no presentan contaminación por hongos, bacterias y virus. Además los brotes jóvenes facilitan su manipulación para aislar el ápice y el meristemo, obteniendo explantes que logran soportar las condiciones *in vitro* a las que son sometidos.

El ápice responde mejor a las condiciones *in vitro* e inicia más rápido su desarrollo que el meristemo.

Cuando hay formación de órganos, la concentración de 4% de azúcar en el medio de cultivo, favorece significativamente el desarrollo, comparado con la concentración de 3% de azúcar.

El efecto de BA y ANA sobre ápices y meristemas dieron como respuesta formación de callo en el 100% de los explantes. En un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento los explantes a partir de ápice y meristemo desarrollan órganos directamente.

El presente estudio describe un proceso eficaz para la etapa de establecimiento del cultivo aséptico de gladiola variedad Amsterdam.

Cuadro 3. Efecto de los factores y sus combinaciones para el experimento de explantes, concentración de azúcar y relación de reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de gladiola.

Factores	Número de brotes	Tamaño de brote (mm)	Tamaño de raíz (mm)	Tamaño de callo (mm)
E1	1.7 a	116.4 a	80.7 a	5.8 a
E2	1.1 b	11.1 b	4.9 b	4.1 b
A1	1.2 b	54.4 b	38.4 b	5.1 a
A2	1.6 a	73.1 a	47.2 a	4.8 a
CV	22.6	6.26	5.15	26.057
DMS	0.8	3.9	2.14	0.5806
RC1				0.0 b
RC2				6.8 a
RC3				6.6 a
RC4				6.5 a
CV				26.057
DMS				0.5806
E*A1				4.82 a
E*A2				5.14 a
CV				6.27
DMS				3.9707
E*RC1				0.0 b
E*RC2				6.8 a
E*RC3				6.6 a
E*RC4				6.5 a
CV				18.43
DMS				2.9216
A*RC1				0.0 b
A*RC2				6.8 a
A*RC3				6.6 a
ARC4				6.5 a
CV				6.71
DMS				1.065
E*A*RC1				0.0 b
E*A*RC2				6.8 a
E*A*RC3				6.6 a
E*A*RC4				6.5 a
CV				19.7425
DMS				1.5494

En las columnas, letras iguales indican sin diferencia significativa (LSD $p < 0.05$). E= explante; A= azúcar; RC= reguladores de crecimiento; CV: coeficiente de variación; DMS: Diferencia mínima significativa.

LITERATURA CITADA

- Aftab, F., M. Alam and H. Afrasiab. 2008. *In vitro* shoot multiplication and callus induction in *Gladiolus hybridus*. Hort. Pak. Jour. Bot. 40(2): 517-522.
- Agramonte, D., F. Jiménez y M. A. Dita. 1998. Aclimatización. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las plantas. 400 pp.
- Budiarto, K. 2009. *In vitro* Regeneration of Three Gladiolus Cultivars Using Cormel Explants. Journal ILMU DASAR 10 (2): 109-113.
- Calva, Pérez. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria, 6(11): ISSN: 1067-6079
- Chandel, R., and R. Deepika. 2010. Recent advances in management and control of Fusarium yellows in Research 18: 361-380. Gladiolus species. Journal of Fruit and Ornamental Plant.
- De Bruyn, M.H. and D.I. Ferreira. 1992. *In vitro* corm production of *Gladiolus dalenii* and *G. tritis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31: 123-128.
- Dharmasena, Karunananda, Eeswara. 2011. Effect of Gibberellic Acid (GA₃) and Sugar on *in vitro* Corm let Formation, Multiplication and *ex vitro* Sprouting of *Gladiolus hybrida* Variety Princess Lee. Tropical Agricultural Research 23(1): 1-10.
- Emek, Y. and B. Erdag. 2007. *In vitro* propagation of *Gladiolus anatolicus* (Boiss.) Stapf. Pak. J. Bot. 39(1): 23-30.
- George, E., M. Hall, Geert-Jan de Klerk. 2007. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition, Volume 1. The Background 501: 35,36.
- González-Pérez, E. 2013. Fenología, Propagación *in vitro* y enfermedades del gladiolo en San Martín Texmelucan, Puebla. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo, Texcoco, Edo. de México, México.
- Goo, D.H., H.Y. Joung and K.W. Kim. 2003. Differentiation of gladiolus plantlets from callus and subsequent flowering. Acta Hort. 620: 339-342.
- Haouala and Salhi. 2012. Axillary Budding and Rooting of gladiolus (*Gladiolus Grandiflorus* Hort.) in salt stress conditions. Afr. J. Hort. Sci. 6: 101-110.
- Jala, A. 2013. Potential of Benzyl Adenine, Naphthalene Acetic Acid and Sucrose Concentration on Growth, Development, and Regeneration of New Shoot and Cormel on Gladiolus. 2013 American Transactions on Engineering & Applied Sciences. <http://TuEngr.com/ATEAS>.
- Jiménez, E. A. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 400 pp.
- Kumar, A., A. Sood, L.M.S. Palni and A.K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57:105-112.
- Memon, N., A. Yasmin, V. M. Pahoja, Z. Hussain and I. Ahmad. 2012. *In vitro* regeneration of gladiolus propagules. Journal of Agricultural Technology 8(7): 2331-2351.
- Memon Jasakni, Qasim & Sharif. 2014. Cormel Formation in Gladiolus Through Tissue Culture. Pak. J. Agri. Sci. 51(2): 475-482.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- Orellana, P. A. 1998. Introducción a la propagación masiva. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología/ J.N. Pérez Ponce. Santa Clara: Instituto de genética de plantas. 400 pp.
- Priyakumari, I. and Sheela, V.L. 2005. Micro propagation of gladiolus cv. "Peach Blossom" through enhanced release of axillary buds. J. Trop. Agric. 43: 47-50.
- Ramírez-Hernández, J. C. 2013. Producción de Material Certificado de gladiola (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) Var. Roja Borrega. Tesis de licenciatura. UACH. Chapingo, México. 45 pp.
- SIAP. 2010. Anuario del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, ciclos 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Torabi-Giglou, M. and B. Hajieghrari. 2008. *In vitro* study on regeneration of *Gladiolus grandiflorus* corm calli as affected by plant growth regulators. Pak. J. Biol. Sci. 11:1147-1151.