

Efecto del tiempo de cultivo y volumen de medio de cultivo por explante en la multiplicación de *Gerbera jamesonii* en Sistemas de Inmersión Temporal

Osbel Mosqueda Frometa, Maritza M Escalona Morgado, Marcos A Daquinta Gradaille

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila. Carretera a Morón, km 9. Ciego de Ávila. Ciego de Ávila. Cuba. CP 69450. e-mail: osbel71@gmail.com

RESUMEN

En la industria florícola mundial, *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. se encuentra entre las diez plantas de flor de corte más comercializada. La especie puede propagarse a través de semillas, de forma vegetativa y mediante técnicas biotecnológicas. Esta última es la más utilizada. Con el objetivo de determinar el efecto del tiempo de cultivo y el volumen de medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de gerbera en Sistemas de Inmersión temporal se realizó este trabajo. Se compararon cuatro tiempos de cultivo (14, 21, 28 y 35 días) y tres variantes de volumen de medio de cultivo por explante (20, 30 y 40 ml). Se utilizó una frecuencia de inmersión cada 8 horas con ventilación adicional y como inóculo agregados de tres brotes. Se comprobó que las dos variables estudiadas influyen en la multiplicación de gerbera en SIT. Con 28 y 35 días de cultivo los brotes de gerbera mostraron mejor calidad morfo-fisiológica y mayor número de brotes por explante. El uso de 40 ml de medio de cultivo por explante incrementó el número de brotes, la masa fresca y el contenido de agua de los explantes.

Palabras clave: flor de corte, frecuencia de inmersión, micropropagación

Effect of culture time and culture medium volume per explant on *Gerbera jamesonii* multiplication in Temporary Immersion System

ABSTRACT

In the world flower industry, *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. is among the ten plants of cut flower more commercialized. The species can be propagated through seeds, vegetative and through biotechnological techniques. The latter is the most used. In order to determine the effect of culture time and volume of culture medium on the *in vitro* multiplication of gerbera in Temporary Immersion Systems, this work was performed. Four culture times (14, 21, 28 and 35 days) and three volume variants of culture medium per explant (20, 30 and 40 ml) were compared. A frequency of immersion was used every 8 hours with additional ventilation and as inoculum aggregates of three shoots. It was verified that the two studied variables influence the multiplication of gerbera in TIS. With 28 and 35 days of culture the gerbera shoots showed better morpho-physiological quality and a higher number of shoots per explant. The use of 40 ml culture medium per explant increased the number of shoots, fresh mass and water content of the explants.

Key words: cut flower, immersion frequency, micropropagation

INTRODUCCIÓN

Gerbera jamesonii Bolus ex Hooker f. es una importante planta de flor de corte en la industria florícola global (Kanwar y Kumar, 2008). En los últimos años ha tenido un gran desarrollo en Europa occidental, donde se destaca a Holanda con extensos cultivos en invernadero (Bhatia *et al.*, 2011). Su importancia económica está en que es una de las flores de corte que más se utiliza porque crece y se adapta a condiciones diferentes en varias áreas del mundo. Por sus atractivas flores debido a su

gran rango de colores, es muy utilizada en arreglos florales.

La gerbera puede ser propagada por semilla, el problema de este método radica en el alto nivel de heterocigosis. El mercado de flor de corte se afecta por este problema, el cual requiere de una floración coordinada (Ludwing *et al.*, 2010). También se puede reproducir por propagación vegetativa con el empleo de estacas de tallo o división del rizoma. Una de las principales debilidades de este método es la baja tasa de multiplicación que se alcanza (Son *et al.*, 2011).

La propagación *in vitro* es la vía más utilizada. Se han obtenidos resultados satisfactorios en la propagación rápida de germoplasma élite con alta fidelidad genética (Kanwar y Kumar, 2008; Cardoso y Teixeira, 2013). La micropropagación de brotes de gerbera se ha establecido a partir de diferentes tipos de explantes que incluyen el cultivo de ápices meristemáticos (Cardoso y Teixeira, 2012), yemas axilares, hojas, peciolo, yemas florales, capítulo floral y óvulos (Cardoso y Teixeira, 2013).

Los bajos coeficientes de multiplicación que posee esta planta, el alto costo por mano de obra y la escasa posibilidad de automatización que presentan los protocolos de micropropagación hace necesaria la búsqueda de nuevas tecnologías asociadas con la semi-automatización del proceso. En este sentido, el desarrollo de protocolos con la técnica de inmersión temporal se utilizan con éxito en la micropropagación de especies ornamentales (Watt, 2012), de interés económico (Wilken *et al.*, 2014) y leñosas (Akdemir *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento, no se tiene información sobre el uso de la inmersión temporal para la propagación de *Gerbera*, aunque existen informes en otras plantas de la familia *Asteraceae*, como son *Chrysanthemum* sp. (Hahn y Paek, 2005) y *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Alvarenga y Salazar, 2015).

Por la alta demanda en el mercado florícola mundial y el escaso material vegetal de propagación que tiene gerbera, se hace necesaria la introducción de técnicas de micropropagación más eficientes. Reducir los costos y aumentar la cantidad y calidad de los brotes en este proceso es imprescindible. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del tiempo de cultivo y el volumen de medio de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Gerbera jamesonii* en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos del Centro de Bioplantas de la Universidad de Ciego de Ávila.

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron brotes de *Gerbera jamesonii* variedad E-5 procedentes

del Laboratorio Comercial VITROALMA, México. Para el crecimiento del material vegetal previo a la inoculación en el SIT, se procedió a su subcultivo cada 21 días en medio de cultivo semisólido. Como explantes se utilizaron agregados con tres brotes cada uno.

Para la multiplicación de los brotes se empleó el medio de cultivo líquido MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, con reducción de los nitratos a la mitad, al que se adicionó nitrato de calcio 800 mg l⁻¹, bencil adenina (BA) 1.0 mg l⁻¹, ácido naftalen acético (ANA) 0.5 mg l⁻¹, sacarosa: 30 g l⁻¹, mio-inositol 100 mg l⁻¹, Tiamina 0.4 mg l⁻¹, Piridoxina 0.5 mg l⁻¹, ácido nicotínico 0.5 mg l⁻¹, glicina 2.0 mg l⁻¹. En los medios de cultivo semisólido se utilizó agar (BIOCEN) 6.6 g l⁻¹. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 previo a la esterilización en autoclave (LDZX - 75KBS) a 1.2 kg cm⁻². El tiempo de esterilización que se empleó fue de 20 y 40 minutos para medio de cultivo semisólido (25 ml) y los SIT (800 ml), respectivamente.

El cultivo se expuso a la luz blanca fluorescente (25-30 μmol m⁻²s⁻¹) a 25 ± 2°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz 8 horas de oscuridad.

Se trabajó con el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) diseñado por Escalona *et al.* (1999). Este constó de dos frascos de vidrio de 1000 ml de capacidad, unidos entre sí por mangueras de silicona, compuesto además por un compresor de aire, electroválvulas y una válvula reguladora. Se utilizaron tres SIT por tratamiento con 20 agregados cada uno, cada agregado cuenta con tres brotes unidos.

Efecto del tiempo de cultivo

Para establecer el tiempo de multiplicación en el SIT se diseñó un experimento monofactorial con los siguientes tiempos de cultivo: 14, 21, 28 y 35 días. La frecuencia de inmersión fue de cada ocho horas, con ventilación adicional de un minuto cada dos horas y un tiempo de inmersión de cuatro minutos. Se utilizaron 20 ml de medio de cultivo por explante.

Efecto del volumen de medio de cultivo

Con el objetivo de determinar el efecto del volumen de medio de cultivo en el SIT, se diseñó un experimento donde se ensayaron: 20, 30 y

40 ml por explante, equivalente a 400, 600 y 800 ml de medio de cultivo en el SIT. La frecuencia de inmersión fue de cada 8 horas, con ventilación adicional de un minuto cada dos horas, tiempo de inmersión de 4 minutos y 28 días de cultivo.

Evaluaciones

Las evaluaciones realizadas para la fase de multiplicación fueron: número de brotes por explante inoculado, longitud de los brotes (cm), número de hojas por brote, masa fresca (g) y masa seca (g) de los brotes. Esta última se obtuvo pesando las plantas inicialmente, después se secaron por 72 horas en una estufa de calor seco a una temperatura de 60 °C. El contenido de agua de los brotes se determinó por la siguiente fórmula y se expresó en porcentaje: $CA\ brotes = (MF - MS) / MF * 100$

Análisis estadístico

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el SPSS (Versión 11.5 para Windows, SPSS Inc.). Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad de las varianzas (Levene). Se

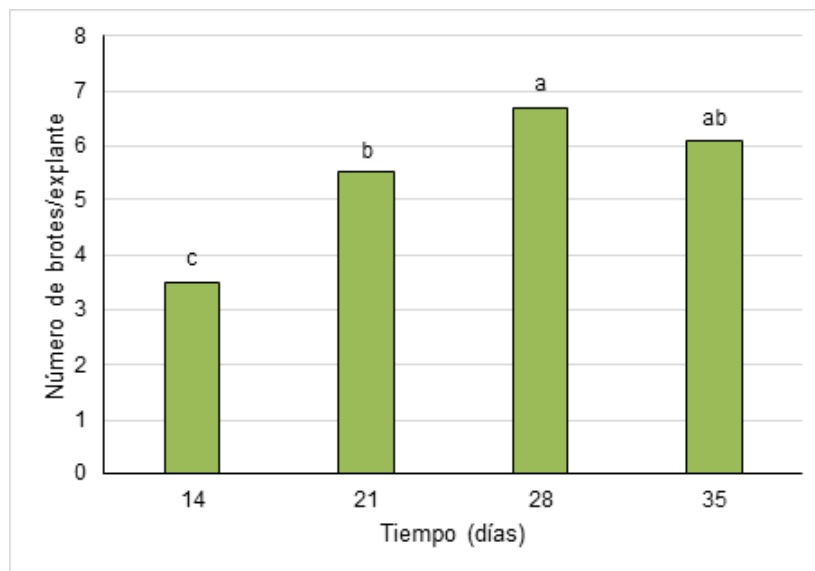
realizó el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rangos múltiples de Tukey para valores de $p < 0.05$. En algunos casos fue necesaria la transformación de los datos para lograr los supuestos de las pruebas paramétricas realizadas las cuales aparecen descritas en los pie de las figuras y tablas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de cultivo

El número de brotes por explante se incrementó en correspondencia con el aumento del tiempo de cultivo. Los mayores valores se encontraron a los 28 y 35 días, sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, este último tampoco tuvo diferencia con respecto a los 21 días. A los 14 días se obtuvo el menor número de brotes (Figura 1).

En los indicadores morfológicos, los brotes con mayor longitud se obtuvieron a los 28 y 35 días de cultivo, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El número de hojas de los brotes, no tuvo diferencias entre 14, 28 y 35 días de cultivo, aunque este último tratamiento no tuvo diferencias con respecto al tratamiento de 21 días (Tabla 1).



Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA de un factor, Tukey, $p < 0.05$). El indicador número de brotes/explante se transformó según $y' = (y)^{0.5}$. Media general: 5.45 brotes. Error estándar: 0.0462 brotes

Figura 1. Número de brotes por explante de gerbera en SIT con diferentes tiempos de cultivo. Los datos representan la media de tres SIT por tratamiento (n=60).

Tabla 1. Efecto del tiempo de cultivo en la longitud y número de hojas de brotes de gerbera en SIT.

Tiempo de cultivo (días)	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas/brote
14	3.43 b	1.83 a
21	3.38 b	1.61 b
28	4.17 a	1.95 a
35	4.15 a	1.78 ab
Significación	*	*
Media general	3.78	1.79
Error estándar	0.1071	0.0271

En una misma columna, medias con letras iguales no tienen diferencias significativas (ANOVA factorial, Tukey, $p < 0.05$). El indicador número de brotes se transformó según $y' = (y)^{0.5}$ ($n=20$)

Tabla 2. Efecto del tiempo de cultivo en la masa fresca, masa seca y el contenido de agua de brotes de gerbera multiplicados en SIT.

Tiempo de cultivo (días)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)	Contenido de agua de los brotes (%)
14	0.1530 b	0.0129	91.5 b
21	0.2055 a	0.0143	93.0 a
28	0.2133 a	0.0145	93.2 a
35	0.2181 a	0.0155	92.8 a
Significación	*	NS	*
Media general	0.1974	0.0143	92.6
Error estándar	0.0059	0.0004	0.0052

En una misma columna, medias con letras iguales no tienen diferencias significativas (ANOVA factorial, Tukey, $p < 0.05$). El indicador porcentaje del contenido de agua de los brotes se transformó según $y' = 2 \arccos(y/100)^{0.5}$ ($n=20$)

El incremento del tiempo de cultivo no produjo un aumento de la masa fresca y el contenido de agua. A partir de los 21 días de cultivo, estas variables mantuvieron una tendencia similar, y los valores oscilaron entre 0.1530- 0.2181 para la MF y de 91.5-93.2 para el contenido de agua. En cuanto a la masa seca no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Tabla 2).

Se observó que la duración del tiempo de cultivo es un factor que tiene influencia en el aumento del coeficiente de multiplicación y la calidad de los brotes durante la fase de multiplicación en SIT. En la micropropagación convencional (semisólido y líquido) esta fase se prolonga entre 21–45 días en dependencia

de la especie. Generalmente el subcultivo se realiza por agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo cuando este se encuentra todavía en la fase exponencial de la morfogénesis, es por ello que evaluar la influencia de este factor en la multiplicación de los brotes es importante para mejorar la eficiencia de la micropropagación (Escalona, 2006).

Los resultados de este estudio concuerdan con los informados en otros cultivos. Autores como Díaz y Castro (2011) en el cultivo de bananos en SIT informaron un aumento del coeficiente de multiplicación con la duración del periodo de cultivo. El mayor coeficiente de multiplicación se logró a los 50 días de cultivo.

Resultados similares describieron Basail *et al.* (2013) para plátano cultivar 'INIVIT PV-2011' donde a partir de los 18 días se mantuvo estable este indicador con valores de 8.15. También, en *Psidium guajava* L. este factor fue determinante en el aumento del coeficiente de multiplicación y calidad morfológica de los brotes cultivados en SIT (Nápoles *et al.*, 2015).

Por su parte, trabajando con *Chrysanthemum* Hahn y Paek (2005), lograron aumentar el número y longitud de los brotes, con incremento en el coeficiente de proliferación respecto a la micropropagación en medio de cultivo semisólido.

En la micropropagación cuando se prolonga el tiempo de formación de brotes, generalmente se provoca un incremento en la multiplicación, debido entre otros factores a un aumento en los niveles de citoquininas endógenas. Este regulador se acumula sólo en forma de sus conjugados, y estimula la proliferación de los brotes (Blakesley y Constantine, 1992). Aspecto este que pudiera explicar el aumento en el número de brotes de gerbera en los SIT en correspondencia con la duración del tiempo de cultivo.

La prolongación del tiempo de cultivo también favoreció la calidad morfológica de los brotes, a partir de los 28 días se observaron brotes más largos y con mayor número de hojas. De igual forma, aumentó la masa fresca de los brotes, lo que estuvo muy relacionado con un incremento en el contenido de agua (Tabla 2). Sin embargo, al evaluar la apariencia de los brotes en su morfología no se encontraron hiperhídricos. Este resultado, en un futuro, debiera ser confirmado a través de determinaciones anatómicas, bioquímicas y fisiológicas. Los brotes a los 35 días de cultivo mostraron una ligera pérdida de coloración (Figura 2), esto pudo deberse al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, o tal vez a pérdida de clorofila, aspecto este que soporta la necesidad de otro tipo de evaluaciones. En *Bambusa vulgaris* el alto contenido de agua de los brotes en cultivos líquidos estáticos provocó disminución de la concentración de fenoles totales, el contenido de ligninas y de clorofilas (García-Ramírez *et al.*, 2014).

A partir de estos resultados se seleccionó 28 días como el tiempo de cultivo adecuado para la multiplicación *in vitro* de la gerbera en SIT.

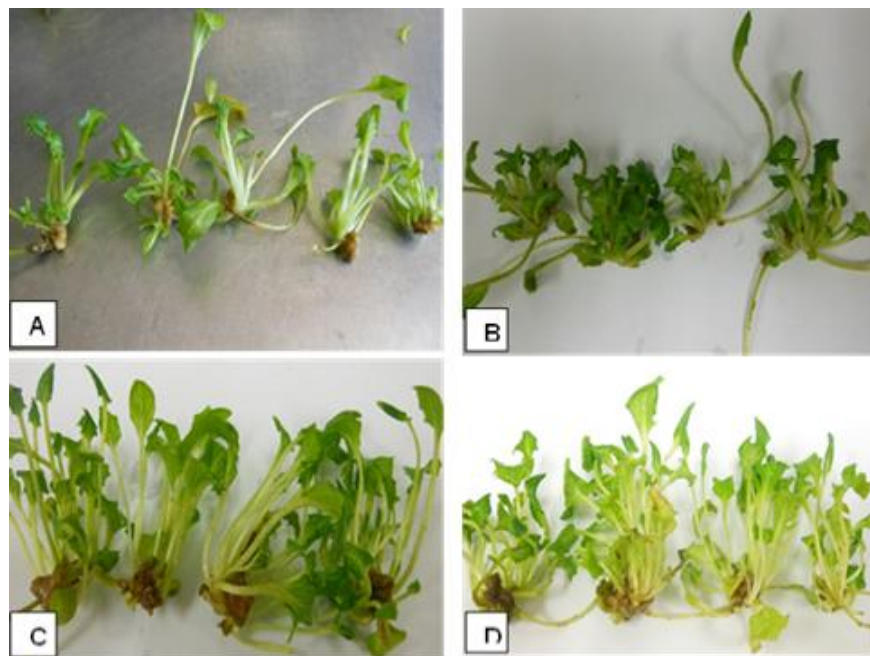


Figura 2. Agregados de brotes de gerbera cultivados en SIT con diferentes tiempos de cultivo. (A) 14 días, (B) 21 días, (C) 28 días y (D) 35 días.

Efecto del volumen de medio de cultivo

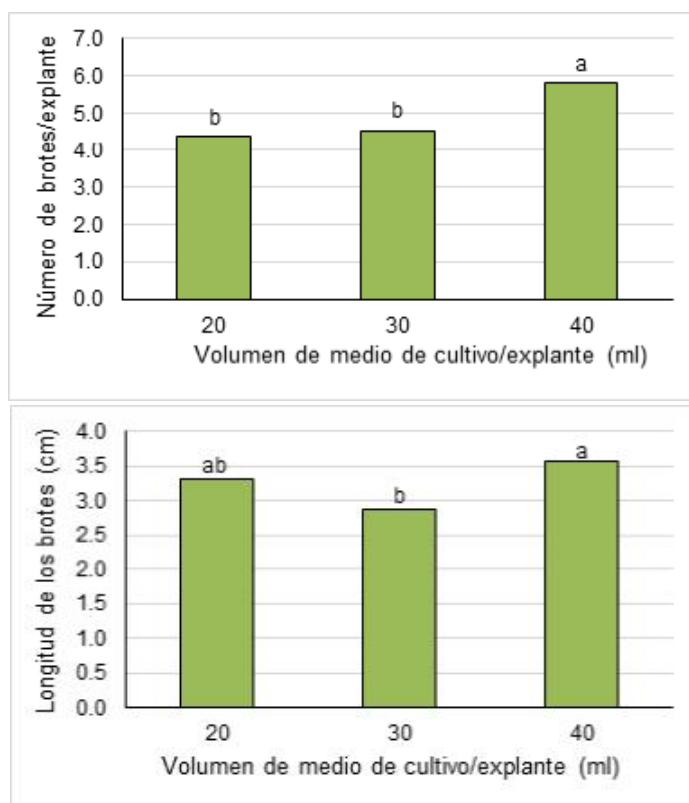
Durante la fase de multiplicación de los brotes de gerbera en SIT, el volumen de medio de cultivo tuvo influencia en el número de brotes por explante. El volumen de 40 ml /explante incrementó este indicador con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 3A).

En cuanto a la longitud, los brotes mayores se presentaron en los tratamientos de 20 y 40 ml/ explante sin diferencias significativas entre ellos y sí entre el de 30 y 40 ml/explante (Figura 3B). No se encontraron diferencias significativas en el número de hojas/brote en los diferentes volúmenes de medio de cultivo que se ensayaron.

Al analizar los indicadores fisiológicos de calidad de los brotes no se encontró un aumento proporcional en función del volumen de medio de cultivo como era esperado. El

mayor valor de masa fresca se encontró con el volumen 40 ml/explante con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Tabla 3). La masa fresca y el contenido de agua fueron significativamente menores en el volumen de 30 ml de medio de cultivo/explante. En cuanto a la masa seca de los brotes, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos y el contenido de agua de los brotes fue significativamente mayor en el volumen de 40 ml/explante (Tabla 3).

El volumen de medio de cultivo es un factor que en la propagación *in vitro* permite mejorar la morfogénesis e indicadores de calidad de los brotes. Emplear una relación adecuada medio de cultivo por explante, generalmente conlleva a un aumento en el número de brotes y a un mejor desarrollo de los mismos, teniendo en cuenta que existe una mayor disponibilidad de los nutrientes, para que estos puedan desarrollarse adecuadamente (Escalona, 2006).



Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). Los indicadores número de brotes y número de hojas se transformaron según $y' = (y) 0.5$ ($n=20$). Media general: 4.92 brotes, 3.25 cm, 3.18 hojas. Error estándar: 0.0485 brotes, 0.0832 cm, hojas 0.0297

Figura 3. Efecto del volumen de medio de cultivo/explante en el número de brotes, longitud y número de hojas de gerbera a los 28 días de cultivo en SIT.

Tabla 3. Efecto del volumen de medio/explante en la masa fresca, masa seca y el contenido de agua de brotes de gerbera multiplicados en SIT a los 28 días de cultivo.

Volumen de medio de cultivo/explante (ml)	Masa fresca (g)	Masa seca (g)	Contenido de agua de los brotes (%)
20	0.1393 b	0.0114	91.8 b
30	0.1047 c	0.0207	80.2 c
40	0.2169 a	0.0135	93.7 a
Significación	*	NS	*
Media	0.1850	0.0147	92.66
Error estándar	0.0080	0.0031	0.0079

En una misma columna, medias con letras iguales no tienen diferencias significativas significativas (ANOVA mono factorial, Tukey, $p < 0.05$). El indicador porcentaje del contenido de agua de los brotes se transformó según $y' = 2 \arccos(y/100)^{0.5}$ ($n=20$)

Este factor debe ser optimizado cuando se emplean Sistemas de Inmersión Temporal, es un aspecto a tener en cuenta para una mayor multiplicación según Etienne y Berthouly (2002) y Georgiev *et al.* (2014). Lorenzo *et al.* (1998) determinaron un volumen óptimo de 50.0 ml/explante para la proliferación de los brotes de caña de azúcar en el SIT con incrementos en el coeficiente de multiplicación a los 30 días de cultivo. Escalona *et al.* (1999) determinaron un volumen óptimo de 200 ml/explante en la proliferación de piña (*Ananas comusus* L.). En otros cultivos como el plátano (*Musa* spp.), Roels *et al.* (2005) informaron que el volumen de 30 ml/explante aumentó no solo el coeficiente de multiplicación (13.8 brotes/explante) sino los indicadores morfológicos de calidad como la altura, número de hojas y número de raíces de los brotes. En bananos (*Musa* spp.), Basail *et al.* (2012) con 50 ml/explante incrementaron el coeficiente de multiplicación (11.82) así como el diámetro del pseudotallo (0.99 cm) y el número de hojas (3.03) de los brotes.

Resultados similares a los descritos anteriormente se encontraron en la multiplicación de gerbera con el empleo de 40 ml de medio de cultivo/explante donde no solo aumentó el número de brotes sino masa fresca y contenido de agua (Figura 4). El efecto de este factor en la multiplicación y calidad de los brotes en el SIT, debe estar relacionado con la cantidad de nutrientes que aporta. El contenido de nutrientes en el medio de cultivo puede variar debido a cambios en

la concentración o por cambios en el volumen de medio a una concentración fija de nutrientes (Kozai *et al.*, 1995). A partir de este resultado se podría considerar que el volumen de medio por explante que se determinó en el SIT para la gerbera, garantizó al final de la fase de multiplicación la suficiente cantidad de nutrientes esencial para el máximo crecimiento de los brotes. Los brotes provenientes de este tratamiento fueron los que mostraron mejores características en todos los indicadores, además del color y el grosor de los tallos y hojas (Figura 4C).

En el cultivo *in vitro*, la fuente de iones es limitada y de una amplia composición. Sin embargo, la asimilación de los mismos depende de la cantidad y forma en que se encuentran disponibles a los brotes existiendo un equilibrio entre el proceso de asimilación y la excreción de compuestos al medio proveniente de los brotes (William, 1995). Esto pudiera explicar porque los brotes que proliferaron con un volumen de medio de 30 ml/explante no mejoraron los indicadores morfológicos y fisiológicos de calidad, ellos pudieron asimilar menor cantidad de nutrientes como se evidenció en la disminución en la masa fresca y el bajo contenido de agua.

La nutrición *in vitro* es un proceso complejo y ha sido poco estudiado no solo para el cultivo en inmersión temporal sino para la micropropagación por métodos convencionales por lo que pudiera resultar interesante en

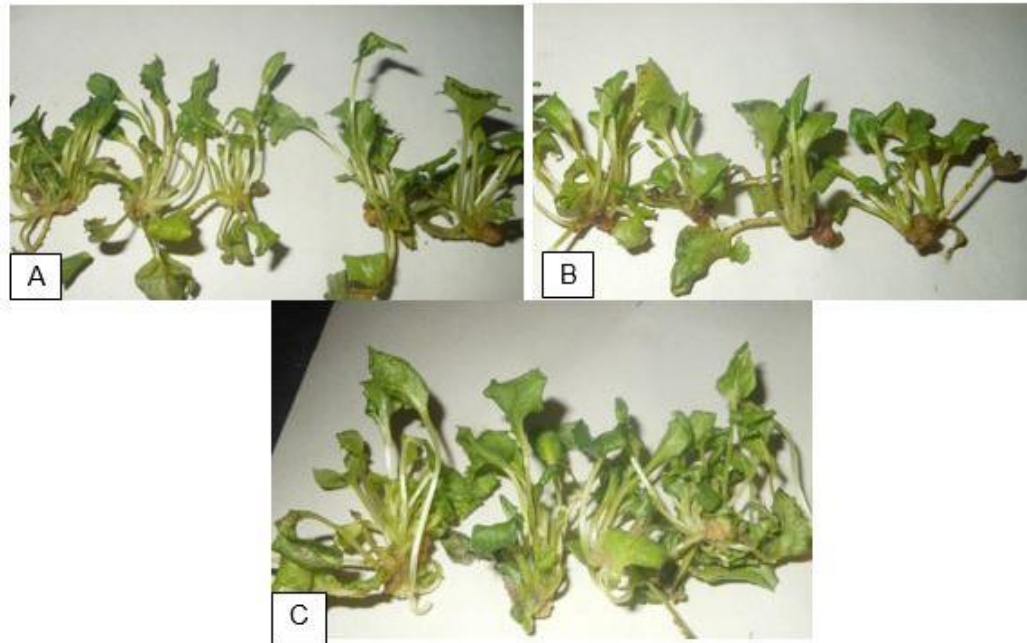


Figura 4. Agregados de brotes de gerbera después de los 28 días de cultivo en SIT en los diferentes volúmenes de medio de cultivo. (A) 20 ml/explante, (B) 30 ml/explante y (C) 40 ml/explante.

investigaciones futuras. De acuerdo con los resultados alcanzados en este experimento, se seleccionó 40 ml de medio de cultivo/explante como adecuado para la proliferación *in vitro* de la gerbera en el SIT.

CONCLUSIONES

Se puede multiplicar gerbera en SIT, mostrando mejor calidad morfo-fisiológica, y mayor número de brotes/explantes a los 28 días de cultivo. Por otra parte con la inoculación de 40 ml/explantes, se logra un aumento del número y la longitud de los brotes, así como de la masa fresca.

REFERENCIAS

Akdemir H, Süzerer V, Onay A, Tilkat E, Ersali Y, Ozden Y (2014) Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117(3): 65-76; doi: 10.1007/s11240-013-0421-0

Alvarenga S, Salazar T (2015) Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoli en Sistema de Inmersión Temporal. *Cultivos Tropicales* 36(3): 50-57

Basail M, Medero V, Torres M, López J, Santos A, Rayas A, Bauta M, Beovidez Y, Ortega A (2013) Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión

temporal del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15(1): 98-107

Basail M, Mederos V, Ventura J, López J, Otero E, Santos A, Torres M, Cabrera M, Rayas A, Bauta M, Beovidez Y (2012) Multiplicación del clon de banano 'FHIA-18' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1): 8-19

Blakesley D, Constantine D (1992) Uptake and metabolism of 6- benzyladenine in shoot culture of range of species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28(2): 183-186; doi: 10.1007/BF00055515

Cardoso JC, Teixeira JA (2012) Micropropagation of *Gerbera* using chloride dioxide (ClO_2) to sterilize the culture medium. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 48(3): 362-364; doi: 10.1007/s11627-011-9418-8

Cardoso JC, Teixeira JA (2013) *Gerbera* micropropagation. *Biotechnology Advances* 31(8): 1344-1357; doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.008

Díaz J, Castro D (2011) Propagación clonal *in vitro* de plantas de banano (*Musa AAA*) clon Giant cavendish en biorreactores de inmersión temporal. *Revista Universidad Católica de Oriente* 31: 31-41

Escalona M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual* 50: 48-50

- Escalona M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, Borroto C, González JL, Desjardines Y (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18(9): 743-74; doi: 10.1007/s002990050653
- Etienne E, Berthouly M (2002) Temporary Immersion Systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69(3): 215-23; doi: 10.1023/A:1015668610465
- García-Ramírez Y, González M, Quiala E, Freire M, La O Cárdenas M, Moreno-Bermúdez L, Hurtado O (2014) Effect of BA Treatments on Morphology and Physiology of Proliferated Shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in Temporary Immersion. *American Journal of Plant Sciences* 5(2): 205-211; doi: 10.4236/ajps.2014.52027
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 14: 607-621; doi: 10.1002/elsc.201300166
- Hahn EJ, Paek KY (2005) Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. En: AK Hroslef-Eide, W Preil (eds). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 143-153. Springer, Berlin; doi: 10.1007/1-4020-3200-5
- Kanwar JK, Kumar S (2008) *In vitro* propagation of *Gerbera* – A Review. *Hort Sci* 35(1): 35–44
- Kozai T, Kitaya Y, Fujiwara K, Smith M, Aitken-Christie J (1995) Environmental measurement and control systems. En: Aitken-Christie J, T Kozai, M L Smith (Eds). *Automation and environmental control in plant tissue culture*, pp. 539-574. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; doi: 10.1007/978-94-015-8461-6
- Lorenzo JC, González JL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54(3): 197-200; doi: 10.1023/A:1006168700556
- Ludwing F, Guerrero AC, Fernández DM, Villas Bôas, RL (2010) Análise de crescimento de gérbera de vaso conduzida em diferentes substratos. *Horticultura Brasileira* 4: 28-70; doi:10.1590/S0102-05362010000100013
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–479
- Nápoles L, Escalona M, Trujillo R, Concepción O (2015) Propagación *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) cv. EEA 18-40 con el uso de los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT®). *Memorias del 10^{mo} congreso Internacional de Biotecnología Vegetal*. Ciego de Avila, ISBN: 978-959-16-2390-4.
- Son NV, Mokashi AN, Hegde RV, Patil VS, Lingaraju S (2011) Response of *Gerbera* (*Gerbera jamesonii* Bolus) varieties to micropropagation. *Karnataka J Agric Sci* 24(7): 354
- Wilken D, Jiménez E, Gerth A, Gómez-Kosky R, Schumann A, Claus D (2014) Effect of immersion systems, lighting and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. 'Grande naine' AAA). *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 50(5): 582-589; doi: 10.1007/s11627-014-9605-5

Recibido: 22-09-2015

Aceptado: 30-11-2015