

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE *Allium sativum* L. var. peruana
OBTENIDO MEDIANTE PROPAGACIÓN *In vitro***

RODRIGO ANDRÉS GARZÓN CHAVES

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2006**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE *Allium sativum* L. var. peruana
OBTENIDO MEDIANTE PROPAGACIÓN *In vitro***

RODRIGO ANDRÉS GARZÓN CHAVES

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

Director:

Mg. NELSON ROJAS MARTÍNEZ

Asesores:

Mg. LEONIDAS ZAMBRANO POLANCO

Biól. MARIA DEL SOCORRO ANAYA FLORES

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2006**

Nota de aceptación

Mg. Nelson Rojas Martínez
Director.

Mg. Diego Macias Pinto
Jurado.

Mg. Oscar Darío Bermúdez
Jurado.

Fecha de sustentación: Popayán, 6 de Diciembre de 2006.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo:

A Dios fuente de vida y sabiduría

A mi madre, Lyda Rosa, que con su amor, confianza y paciencia me ha apoyado en cada momento de mi vida para hacer de mis sueños una bella realidad.

A mi abuela Olga, mis hermanos Fernando y Johanna, tíos y demás familiares por su cariño y confianza en mí.

A la memoria de mi tío Víctor Manuel que será por siempre para mí un padre, un ejemplo de perseverancia y fortaleza y quien a lo largo de su vida me brindó todo su cariño, confianza y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios principalmente por darme la vida y ser mi soporte.

A la Universidad del Cauca y al departamento de Biología por la formación académica y humana recibida

Al profesor Mg. Nelson Rojas Martínez, por la dirección de trabajo, por su valioso aporte científico e interés para la elaboración, realización y culminación satisfactoria del trabajo de grado.

Al profesor Mg. Leonidas Zambrano por su asesoría en la fase de campo y el interés para la realización y culminación de esta fase.

A la Bióloga María del Socorro Anaya del laboratorio de Biotecnología Vegetal SENA-Regional Cauca, por su valiosa asesoría en el cultivo de tejidos vegetales *In vitro* y su gran interés y confianza que depositó para desarrollar el trabajo con su experiencia profesional y calidad humana; como también por su amistad y colaboración desinteresada.

A la Bióloga Margarita Chagüendo del laboratorio de Biotecnología Vegetal SENA-Regional Cauca, por su valiosa asesoría en cuanto a extracción de ápices caulinares de ajo (*Allium sativum* L.), para la siembra *In vitro*; como también por su amistad y colaboración.

Al profesor Apolinar Figueroa Ph.D, Director del Jardín Botánico “Álvaro José Negret” y del Grupo de Estudios Ambientales (GEA) de la Universidad del Cauca,

por facilitarme un espacio de terreno para la realización de la fase de campo del Trabajo de Grado.

Al Ingeniero Agrónomo Carlos Quintín, Administrador Agropecuario de la finca La Rejoya de la Universidad del Cauca, por su enseñanza en cuanto al manejo de la siembra y tratamiento del suelo.

Al mayormodo de la finca, Andrés Arcos por su entera disposición y colaboración.

Al profesor Mg. Silvio Carvajal por su desinteresada ayuda en la parte estadística.

A mi compañero de laboratorio Álvaro Lora, por su amistad, apoyo y colaboración durante el tiempo de trabajo.

A mis compañeros del programa de Biología, amigos y todas las personas que de cualquier manera contribuyeron a la finalización de este trabajo.

Al SENA -Regional Cauca por el apoyo brindado en el establecimiento del cultivo de tejidos vegetales *In vitro*, realizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las especies hortícolas más extensamente estudiada por sus propiedades terapéuticas y profilácticas en el ser humano. También se considera de gran importancia en la alimentación y fuente de ingresos de los agricultores. Actualmente este cultivo presenta una serie de problemas fitosanitarios, destacándose la presencia de plagas, enfermedades fungosas, bacterianas y virales, que son las que más influyen en el deterioro del cultivo, causando pérdidas del 50% o más del rendimiento en cuanto a producción y productividad.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la técnica biotecnológica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como una alternativa viable de producción de semilla vegetativa sana, evaluando y comparando los resultados biométricos, como indicadores de productividad.

Se seleccionaron ajos de buena calidad sanitaria, los cuales se sometieron a un proceso de vernalización (4°C durante un mes) y termoterapia (7 días a 34°C; 14 días a 36°C y 21 días a 38°C). Se utilizaron como material vegetal de explante ápices caulinares, se desinfectaron y luego se cultivaron en el medio basal Murashige-Skoog enriquecido con KIN + AIA (0.1 mg/L) para la fase de iniciación y con 2 ip (3.0 mg/L)+ ANA (0.3 mg/L) para la fase microbulbificación. Una vez obtenidas las plántulas se transplantaron a un sustrato estéril en condiciones de invernadero (temperatura máxima 46°C y una mínima de 14°C, humedad relativa 50-60%) por un tiempo de 30 días y después se transfirieron a campo.

Los resultados que se obtuvieron en el cultivo *In vitro* en la etapa de iniciación fueron 15.5% de contaminación, en la microbulbificación un 2.5% de contaminación y en el cultivo *Ex vitro* en la etapa de preadaptación el 60.01% se regeneraron y en la etapa de campo se adaptaron el 46.49%. El porcentaje general de desarrollo y de adaptación de las plantas de *Allium sativum* L. var. peruana, obtenidas *In vitro* fue de un 22.9%.

Se sembraron ajos por propagación vegetativa como grupo control, para establecer la comparación con las plantas de ajo obtenidas *In vitro* y su resultado fue de un 83.9% de desarrollo de plantas, pero las obtenidas *In vitro* se obtuvieron mejores calidades fitosanitarias.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
2 JUSTIFICACIÓN	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GENERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MARCO TEÓRICO	20
4.1 TAXONOMÍA Y RELACIONES FILOGENÉTICAS	20
4.2 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	20
4.3 REQUERIMIENTO DEL CULTIVO	21
4.4 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO	21
4.5 ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DEL CULTIVO DEL AJO	22
4.5.1 Fisiología del desarrollo del ajo	22
4.5.2 Factores que afectan la iniciación y el desarrollo del bulbo	22
4.5.3 Dormancia de los bulbillos	22
5. ANTECEDENTES	23
5.1 CULTIVOS DE TEJIDOS	23
5.2 FACTORES A TENER EN CUENTA PARA LA MICROPROPAGACIÓN	23
5.2.1 Selección del explante	23
5.2.2 Desinfección	24
5.2.3 Medio de cultivo	24
5.2.4 Condiciones ambientales de incubación	25
5.2.4 Adaptación	25
5.3 EMPLEO DE LAS TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS EN LAS ALIACEAE	26
6. METODOLOGÍA	29
6.1 CLASIFICACIÓN Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	29
6.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA PROPAGACION <i>IN VITRO</i>	30
6.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	31
6.3.1 Etapa I. Iniciación	31
A. Termoterapia	31
B. Desinfestación de explantes	32
C. Desinfección de explantes	32
D. Incubación	32
6.3.2 Etapa II. Microbulbificación	33
6.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	34
6.5 CULTIVO <i>EX VITRO</i>	37

6.5.1 Etapa de aclimatación o preadaptación	37
6.6 ETAPA DE CAMPO	37
7. RESULTADOS	39
7.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	39
7.2 CULTIVO <i>EX VITRO</i>	40
7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
7.3.1 Evaluación de la Productividad de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidos por propagación vegetativa e <i>in vitro</i>	42
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	59
10. RECOMENDACIONES	61
11. BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO 1	70

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Componentes orgánicos e inorgánicos del medio MS utilizado para las etapas de iniciación y microbulbificación de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana.	36

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Contaminación de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana por cultivo <i>in vitro</i> en las etapas de iniciación y microbulbificación	39
Cuadro 2. Adaptación de plántulas de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana, cultivo <i>ex vitro</i> en las etapas de aclimatación y campo.	40
Cuadro 3. Adaptación y desarrollo global de las plantas <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas por propagación <i>In vitro</i> y vegetativa	41
Cuadro 4. Análisis estadístico descriptiva de la productividad de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidos por propagación <i>in vitro</i> y vegetativa	43
Cuadro 5. Prueba t student para muestras independientes de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas por propagación <i>in vitro</i> y vegetativa	44

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Selección del material vegetal de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana para la propagación <i>in vitro</i> y vegetativa.	29
Figura 2. Técnica de extracción de ápices caulinares de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana para la propagación <i>in vitro</i> .	31
Figura 3. Incubación de ápices caulinares de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana en el medio MS.	33
Figura 4. Plántulas de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> .	34
Figura 5. Diseño de parcelas de estudio para <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> y vegetativa.	38
Figura 6. Plántulas de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante cultivo <i>In vitro</i> , etapa microbulbificación.	40
Figura 7. Plantas de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>In vitro</i> .	42
Figura 8. Evaluación de la talla de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> y vegetativa.	46
Figura 9. Evaluación del diámetro de bulbo de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> y vegetativa.	47
Figura 10. Evaluación del enraizamiento de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> y vegetativa.	48
Figura 11. Evaluación del número de hojas de <i>Allium sativum</i> L. var. peruana obtenidas mediante propagación <i>in vitro</i> y vegetativa.	49

Figura 12 Evaluación del número de dientes de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa. 50

Figura 13. Evaluación del peso fresco de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa. 51

INTRODUCCIÓN

El cultivo del ajo se encuentra muy extendido por todo el mundo, a pesar de que todavía tiene consideración de hortícola. El ajo es muy apreciado en los países asiáticos, europeos y Latinos como condimento y por sus propiedades medicinales. Los principales países productores de ajo son: China, República de Corea, Thailandia, Egipto, India, Estados Unidos, Argentina, Italia, Turquía, Francia, Brasil y España (FAO, 1990).

En Colombia el cultivo de ajo se encuentra distribuido en áreas secas y frías, especialmente en Cundinamarca (Cajicá, Funza); Boyacá (Sáchica, Duitama, Villa de Leyva, Santa Rosa de Viterbo); Nariño (Gualmatán, Contadero); Valle del Cauca (Tenerife) y Silvia en el Cauca.

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las especies hortícolas más extensamente estudiada por sus propiedades terapéuticas y profilácticas en el ser humano. A parte de sus tradicionales usos como fuente de principios antibióticos y antidiabéticos, recientemente se ha comprobado que es fuente de sustancias anticarcinogénicas, hipocolesterolémicas, antioxidantes y fibrinolíticas, gracias a la eficacia de los compuestos encontrados en la planta (tiosulfatos, sulfóxidos de cisteína y flavonoides) que tienen un efecto inhibitorio de la carcinogénesis (Benjamín, et al., 1983). También son considerados de gran importancia en la alimentación y fuentes de ingresos de muchos campesinos e indígenas del departamento del Cauca y de la geografía andina.

A pesar de que el cultivo del ajo presenta una alta rentabilidad el agricultor no ha logrado sacar provecho de esta actividad mostrando una considerable reducción en la producción y productividad, principalmente por cuatro factores como son:

inadecuado manejo de cultivo, malas prácticas de almacenamiento, falta de semilla de buena calidad y el mercadeo del producto. La reducción del área de siembra y de la producción se debe también a la incidencia y severidad de numerosos problemas fitosanitarios, destacándose la presencia de nemátodos, enfermedades fungosas, bacterianas y virales, que son las que más influyen en el deterioro del cultivo, causando pérdidas del 50% o más del rendimiento (Abiko and NISHI,1980; Messiaen et al., 1993). Aquí es donde el empleo de la técnica biotecnológicas en especial el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, debe considerarse como una alternativa viable para la producción de semilla vegetativa sana, sin la necesidad de recurrir a la utilización de plaguicidas o a la implementación de tratamientos termo o quimioterapéuticos costosos y poco efectivos.

Se debe tener en cuenta el manejo adecuado del suelo con tratamientos de fertilizantes biorgánicos, control oportuno de arvenses y hospederos alternos de nemátodos, rotación de cultivos con especies resistentes a la plaga, como papa o maíz, para romper el ciclo de las plagas y la eliminación de focos de plantas re infectadas con nemátodos.

El objetivo del trabajo es evaluar la producción y productividad del ajo variedad peruana obtenido mediante propagación *In vitro* y su comparación con el ajo producido por propagación vegetativa.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La economía del departamento del Cauca es esencialmente agraria, sobresaliendo la agricultura tradicional, extensiva y de baja capacidad productiva. Actualmente cultivos como el de ajo presentan una serie de problemas fitosanitarios, destacándose la presencia de plagas, enfermedades fungosas, bacterianas y virales, que son las que más influyen en el deterioro del cultivo, causando pérdidas del 50% o más del rendimiento en cuanto a producción y productividad (Abiko and NISHI, 1980; Messiaen et al., 1993). Los limitantes son el uso de las técnicas biotecnológicas aplicada en los procesos agrícolas, entre otras. La producción del ajo presenta una alta rentabilidad para los agricultores, pero no han logrado sacar provecho por el mal manejo en la selección de semilla, por la escasa o casi nula fertilización edáfica y rotación de cultivos, incumpliendo con las mínimas normas de sanidad vegetal, por consiguiente se pretende establecer una metodología eficiente para la obtención de plantas sanas y de buena calidad, mediante la técnica del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, como una alternativa viable y rápida de producción de semilla certificada y así contribuir al mejoramiento de los cultivos del ajo y obtener bancos de germoplasma de buena calidad sanitaria, sin exponer a riesgos y costos que significa mantenerlas *in vivo* (Wilkins and Dodds, 1983 y Espinoza et al., 1986).

Debido a la alta demanda que tiene el ajo por la población, es necesario realizar investigaciones y para ello se ha establecido el siguiente trabajo con el objetivo de aportar resultados obtenidos por propagación *In vitro* y vegetativo, considerando que la biotecnología vegetal es una gran herramienta para obtener material vegetal de alta calidad biológica y se racionaliza el uso de plaguicidas o la implementación de tratamientos termo o quimioterapéuticos costosos y poco efectivos.

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo del ajo presenta una alta rentabilidad, sin embargo, el agricultor no ha obtenido mayores beneficios debido al manejo de las semilla, que lo hace más susceptibles a la acción de patógenos en especial del nemátodo *Ditylenchus dipsasi* Stone, que trae como consecuencia la invasión de bacterias, hongos y virus que se asocian al ataque y en los últimos años se han extendido masivamente a nivel mundial. Esta problemática de desmejoramiento en los cultivos, tiene como precedente la mala utilización del material vegetal, ya que los agricultores emplean la semilla procedente de la misma finca o de fincas cercanas, facilitando el aumento de la infestación en el área cultivada. Culturalmente las dificultades están relacionadas con la práctica común del productor, vender su mejor producto y dejar semillas sin las mínimas normas de sanidad vegetal. El problema de heterosis en el manejo de semilla.

Se han establecido trabajos de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, con el fin de reducir los patógenos que afectan al desarrollo de la planta, pero no se han estudiado las fases de adaptación, campo y su productividad.

Este estudio es importante porque se evalúa la producción y productividad de "semilla" de germoplasma cultivado *In vitro* y propagación vegetativa directa en campo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción y productividad del ajo (*Allium sativum* L.) var. peruana obtenida mediante propagación *in vitro* y su comparación con el ajo producido por propagación vegetativa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener plantas con la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, como una alternativa viable de producción sana de semilla vegetativa.
- Evaluar y comparar los resultados de altura, peso fresco, números de hojas, enraizamiento, diámetro del bulbo y número de dientes como indicadores de productividad.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 TAXONOMIA Y RELACIONES FILOGENÉTICAS

Allium, es un género muy diverso de la familia Liliaceae, entre las especies más populares y domesticadas están la cebolla (*Allium cepa*), el chalote (*Allium ascalonium*), el puerro (*Allium porrum*) y el ajo (*Allium sativum*), todos con $x = 8$ cromosomas (Traub, 1968).

No se conocen formas silvestres, sino sólo cultivadas, siendo *Allium longicuspis* su probable ancestro. La domesticación del ajo desarrolló un camino diferente al de la cebolla y el puerro, que poseen grandes cantidades de semillas para su propagación; éste, en cambio se propaga exclusivamente por bulbillos o dientes (Koul y Gohil, 1970). Algunos genotipos forman flores entremezcladas con bulbillos, pero nunca producen semillas viables, aunque Etoh (1983), reporta la germinación de semillas provenientes de la floración *in vitro* de algunos materiales.

4.2 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El ajo es una planta anual de reproducción vegetativa, que al finalizar su ciclo de vida muere, quedando con vida las yemas que se forman en los dientes, mediante las cuales realiza su reproducción. Su sistema radical es de tipo barba, muy parecido al de la cebolla; las raíces son adventicias y crecen del tallo verdadero, alcanzan una profundidad de 5 – 45 cm, las hojas se forman después de terminado el estado de reposo de los dientes y consta de limbo y vaina en forma de canal (MINAG, 1983).

4.3 REQUERIMIENTO DEL CULTIVO

Este cultivo requiere clima fresco a frío durante el desarrollo inicial y caluroso y luminoso desde que comienza a formarse el bulbo hasta la cosecha. Requiere para su cultivo suelos profundos y fértiles, de consistencia media, permeables, con una proporción equilibrada de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K). Los riegos tienen gran importancia, ya que interactúan con otros factores, tales como los bioclimáticos y la fertilización. Para lograr un crecimiento satisfactorio y una producción aceptable es conveniente mantener el suelo prácticamente a capacidad de campo durante todo el período (Savón et al., 1987; León, 1991; Giaconi, 1993).

La madurez se conoce por el cambio de color de las hojas y el falso tallo, existiendo diversos criterios, ya sea la presencia de sólo dos o tres hojas nuevas verdes o la flexión de la planta para realizar la cosecha del cultivo. Cuando se trata de ajo para semilla y siempre que las condiciones lo permitan, la cosecha deberá efectuarse a madurez plena, es decir, cuando la planta no sólo se pone amarilla sino que se seca, garantizando el traslado de todos los productos de síntesis al bulbo (Burba, 1992; Giaconi, 1993).

4.4 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO

Entre las plagas y enfermedades que más afectan el cultivo se encuentran el nemátodo *Ditylenchus dipsasi* y los hongos *Penicillium corymbiferum*, *Alternaria porri* y *Sclerotium cepivorum* y los virus que pueden provocar pérdidas económicas hasta un 50% de rendimiento, esto se debe a que la contaminación atribuida antiguamente a un solo virus, se produce por lo general por un complejo viral compuesto por lo menos por dos o más carlavirus y potyvirus, entre los que se encuentran: virus del mosaico del ajo (GMV), virus latente del ajo (GLV), virus

del estriado amarillo del ajo (GYSV), virus latente del clavel (CLV), virus latente del chalote (SLV), virus del estriado amarillo del puerro (LYSV) y virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV). Este último es el más difícil de erradicar (MINAG, 1983; Conci et al., 1987; Van Dijk et al., 1991; Burba, 1992; Engeland, 1996).

4.5 ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DEL CULTIVO DEL AJO

4.5.1 Fisiología del desarrollo del ajo. El bulbo del ajo una vez recolectado posee una característica particular: se encuentra en estado de latencia o dormancia. Esta circunstancia conjuntamente con las que vienen determinadas por el origen de la especie condicionan no sólo los buenos resultados del cultivo, sino también su conservación y comercialización (Stahlschmidt *et al.*, 1997).

4.5.2 Factores que afectan la iniciación y el desarrollo del bulbo. Las condiciones normales de cultivo, la bulbificación del ajo requiere la exposición a bajas temperaturas seguida de días largos. Las temperaturas y duración del periodo de frío necesario para inducir la bulbificación es muy variable con los distintos cultivares (García, 1998).

4.5.3 Dormancia de los bulbillos. El ajo recién cosechado, normalmente presenta los “dientes” dormidos y no brotan si es plantado inmediatamente, aún en condiciones óptimas. La dormancia de una yema puede definirse como el estado de suspensión temporaria del crecimiento visible aún cuando el órgano se encuentre en condiciones ambientales que promueven el mismo. Esta suspensión del crecimiento es causada por factores internos fisiológicos (Mann, 1952).

5. ANTECEDENTES

5.1 CULTIVO DE TEJIDOS

Aún cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos, importantes antecedentes se remontan a los años 1838 y 1839, en que los biólogos alemanes Schleiden y Schwann, dejaban implícitamente el concepto de totipotencia de las células, a través de la Teoría Celular, la cual explicaba la complejidad de los organismos celulares sugiriendo que cada célula es una unidad independiente capaz de formar un organismo completo si se le pone en condiciones favorables (Krikorian, 1991).

Pierik (1990) demostró que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad. Esta hipótesis no pudo ser demostrada hasta que White en 1934 citado por Villalobos (1990), comprobó que era factible cultivar con éxito órganos vegetales y utilizó para ello raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y Nobercourt en 1939 citado por Villalobos (1990), obtuvo raíces adventicias de un callo de zanahoria (*Daucus carota*). Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de la totipotencialidad celular.

5.2 FACTORES A TENER EN CUENTA PARA LA MICROPROPAGACIÓN

5.2.1 Selección del explante. Prácticamente se puede utilizar cualquier porción o parte de la planta; para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro* en primera instancia dicha selección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal que se trate. Generalmente, se emplean plantas sanas y vigorosas y dentro de

éstas, las zonas que se encuentran en activa multiplicación, como los meristemos. Las plantas jóvenes son las que aportan los explantes más activos, ya que la potencialidad disminuye con la edad y el tamaño del explante, es otro aspecto que se debe tener en cuenta, pues la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con su disminución (Mroginski, 1991).

5.2.2 Desinfección. La contaminación por microorganismos provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos. Existen formas para controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que lo introducen.

Diversos compuestos químicos se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes, se emplean con mayor frecuencia el etanol (70% v/v) y el hipoclorito de sodio (1-3%) y con menor frecuencia se utiliza el hipoclorito de calcio (6-12%) y el bicloruro de mercurio (0.1-1.25%), aunque con este compuesto por lo general se obtienen mejores resultados, es altamente tóxico y no se remueve con facilidad del explante (Márgara, 1998; Jiménez, 1998).

5.2.3 Medio de cultivo. El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales en proporción y dosis específicos (Smith y Street, 1992). Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como del pH del medio y del agente solidificante (Márgara, 1998).

Para el cultivo de meristemos y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio MS (Murashige-Skoog) basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*.

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Smith y Street, 1992; Dixon, 1994; Jiménez, 1998).

5.2.4 Condiciones ambientales de incubación. Este requisito se debe cumplir rigurosamente para el éxito en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Para ello es conveniente que los explantes se incuben en ambientes controlados de luz (1000 – 5000 lux) y temperatura (20 – 28°C), así como de humedad relativa (70 – 80%) acordes con los objetivos de trabajo. Estos efectos influyen prácticamente en todos los tipos de procesos: absorción de agua, transpiración, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, entre otros (Pierik, 1990; Roca, 1991). No obstante, se debe tener en cuenta que cada cultivo tiene sus propias especificidades.

5.2.5 Adaptación. El mayor obstáculo para el establecimiento de las plántulas que se obtienen por métodos *in vitro* es usualmente la transición del cultivo aséptico a un medio no estéril y condiciones de campo (Novak, 1980), por lo que esta etapa reviste una gran importancia. En ella se realiza el trasplante de las plántulas al suelo y su posterior adaptación al medio ambiente. Para lograr un alto índice de sobrevivencia se necesita que las plantas tengan un sistema radical bien desarrollado y una alta humedad, necesaria para su protección lo que evita su desecación en los días posteriores al trasplante a suelo.

5.3 EMPLEO DE LAS TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS EN LAS ALIACEAE

Los primeros trabajos que se publicaron relacionados con la obtención de plantas de ajo libres de virus mediante el empleo de las técnicas biotecnológicas fueron los de Huang y Millikan en 1977 y Kehr y Schuffer en 1976 citados por Walkey et al. (1987).

Bhojwani (1980), evaluó el comportamiento *in vitro* del clon de ajo francés “Rose de Kakylis” previamente saneado de virus. Desinfectó los dientes con etanol 30 segundos seguidos de flameo, aisló los ápices caulinares entre 5-8 mm y los inoculó en el medio basal B₅ suplementados con 0.5 mg/L de Ácido Isopentil Amino Purina (2-ip) y 1 mg/L de Ácido Naftalén Acético (ANA), obteniendo 5.8 brotes/explante como promedio en un mes mientras que con 0.5mg/L de Ácido Bencil Amino Purina (6-BAP) sólo obtuvo entre 2-4 brotes mientras que con el medio Murashige-Skoog (MS) basal con las mismas concentraciones de ANA y 2-ip solamente logró 2.6 brotes/explantes. Al transferir las plántulas al medio B₅ con 0.2mg/L de ANA como suplemento “hormonal” logró el 100% de enraizamiento; la adaptación a campo de las vitroplantas se realizó en un medio que contenían como sustrato pumita: turba (4:1), pero sólo poco más del 50% logró sobrevivir.

Uno de los primeros informes relacionados con la Microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada fue realizado por Racca (1989). Este autor plantea que es posible utilizar como fuente de explante inicial ápices caulinares o meristemos y obtienen una tasa de multiplicación de 1: 8 aproximadamente cada 60 días para los clones “Rosado Paraguayo” y “Blanco” cuando se cultivan en un medio MS diluido a la mitad suplementado con 0.3 ppm de ANA y 3 ppm de 2-ip, fotoperiodo corto (10 horas luz) y temperatura (18°C), pero las pérdidas fueron superiores al 70% cuando se transfirieron las plántulas propagadas *in vitro* directamente a campo. Este inconveniente lo solucionó transfiriendo las

vitroplantas después de la fase de multiplicación a un medio MS diluido a la mitad sin suplemento de auxinas ni citoquininas, días largos (16 horas luz) y temperatura (22°C); a los 90 días obtuvo un 62% de bulbificación con 60 g/L de sacarosa sin cloruro de clorocolina (CCC) y un 61% con 40g/L de sacarosa y 500 ppm de CCC. Este autor reporto que alcanzaron a sobrevivir un 85% en campo, siempre y cuando su tamaño sea superior a los 3 mm de diámetro. Posteriormente Racca et al. (1989), informan que es más eficiente la inducción de los microbulbillos *in vitro* en un medio MS suplementado con 50g/L de sacarosa.

La FAO (1991), plantea, que los microbulbillos de ajo que se obtienen por cultivo *in vitro* poseen gran variabilidad de tamaño, que puede ser definido por su diámetro transversal o por su peso unitario, existiendo una alta correlación exponencial entre ambos parámetros. Agrega, que los microbulbillos mayores de 4 mm tienen mayor posibilidad de implantarse, crecer y formar minibulbillos de 10-25 mm de diámetro. Plantea también, que la producción de semilla básica debe realizarse inicialmente en condiciones protegidas y posteriormente en zonas aisladas para evitar la reinfección de los materiales en poco tiempo.

Gómez (1992), informa que obtuvo un 88-90% de sobrevivencia cuando los dientes de ajo de los clones “criollo” de establecimiento *in vitro*, las vitroplantas se transfirieron a la fase de adaptación, colocando las vitroplantas en recipientes con materia orgánica durante 6 meses a la luz natural para obtener la semilla prebásica.

Gómez et al. (1993), hacen referencia a la obtención de diferentes genotipos de ajo libres de virus mediante cultivo de meristemas, que en condiciones de campo alcanzaron un porcentaje de bulbificación entre 67-88% para los clones “Criollo” y 75% para el “Vietnamita”.

Izquierdo (2000), estudió los clones “Criollo 3”, “Criollo 6”, “Criollo 9”, Martínez y Vietnamita en cada fase para la micropropagación del cultivo y obtuvo como resultado que tanto el hipoclorito de calcio (5%-20´) como el hipoclorito de sodio (10%- 15´, con 5% de Cl₂ activo) son efectivos en la desinfección de explantes, sobrevivencia y vigor de las plántulas; los explantes se establecen mejor y en menor tiempo en medio MS basal suplementado con ANA (0.1 mg/L) + KIN (0.1 mg/L); se obtienen entre 4.9-7.3 brotes/explante, en dependencia del subcultivo y del clon en el medio anterior enriquecido con ANA (0.1 mg/L) + 2-ip (4 mg/L); el mayor porcentaje de bulbificación *in vitro* se induce en el medio basal antes citado cuando se le adicionan 75 g/L de sacarosa y los microbulbillos son superiores a las vitroplantas, alcanzan entre 95.35-99.40% de sobrevivencia cuando se plantan a un sustrato compuesto por Zeolita (25%) + M.O (75%). En la fase de campo el número de dientes/bulbo, diámetro del bulbo, masa media y anchura del diente fueron los que más contribuyeron a la variabilidad. El rendimiento alcanzado por estos genotipos fue: “Criollo-3” (13.28 T/ha), “Criollo-6” (13.52 t/ha), “Criollo-9” (15.01 t/ha) y “Vietnamita” (11.43 t/ha) durante la fase de producción de semilla básica de alta calidad biológica durante el periodo 1997-1999. Con los resultados obtenidos, estableció una nueva metodología para la propagación *in vitro* de estos genotipos de ajo hasta la fase de campo con rendimientos superiores a los informados para el país (MINAG, 1983) y a los de la FAO (1997).

6. METODOLOGÍA

6.1 CLASIFICACIÓN Y SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El éxito de la propagación *in vitro* depende principalmente de la selección de los ejemplares que se van a trabajar en el laboratorio (Figura 1). El criterio más importante es la selección genética, teniendo en cuenta las características fenotípicas del ajo variedad peruana por considerarse una muestra de mejores calidades sanitarias (Mroginski, 1991).

Una vez seleccionadas las muestras, se desgranaron y se sometieron al proceso de vernalización a 4°C durante un mes, para inducir la ruptura de la dormancia y de ésta manera activar su metabolismo germinativo. Este tratamiento se utiliza teniendo como referencia el trabajo de investigación de Tobar (1997), citado por Chagüendo (1999).



Figura 1. Selección del material vegetal de *Allium sativum* L. var. peruana para la propagación *in vitro* y vegetativa.

6.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA PROPAGACION *IN VITRO*.

De las cabezas de ajo, se seleccionaron dientes de 2.5-3.0 cm. de largo y 3.5-5.0 g de peso, por ser más homogéneas. Una vez seleccionados los dientes de ajo se cortaron a la mitad y se lavaron en agua más jabón desinfectante, más tres gotas de tween 20 con agitación continua durante cinco minutos, luego se lavaron los explantes en agua destilada de 3 a 5 veces y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 5%, más tres gotas de tween 20 durante 15 minutos. Posteriormente se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se lleva a cabo la desinfección de los explantes. Los explantes se lavaron en agua destilada cinco veces y con la ayuda de pinzas y bisturí se realizaron cortes longitudinales alrededor del diente hasta llegar al ápice (figura 2). Una vez obtenidos todos los ápices se colocaron en solución de etanol al 70% durante un minuto. Luego se trasladaron a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) 1% más tres gotas de tween 20 con agitación continúa de 3 a 5 minutos. Finalmente, se lavaron con agua destilada estéril y se inocularon teniendo en cuenta que los ápices exhiban una talla de 8 mm, La siembra se llevó a cabo en recipientes de vidrio con un volumen de 20 ml del medio MS (Murashige-Skoog), más los fitorreguladores de crecimiento Auxinas y Citocininas, en particular la Cinetina-6 furfurilaminopurina (KIN), Ácido Indol Acético (AIA), 2 dimetil Allil Aminopurina (2 ip) y el (ANA) Ácido Naftalén Acético (Tobar, 1997). Luego se trasladaron a la cámara de crecimiento con las siguientes condiciones reguladas: fotoperiodo de 16 horas, temperatura 24-30°C, intensidad lumínica de 298-762 lux y una humedad relativa del 67%, por un periodo de seis semanas.

Las condiciones asépticas de la cámara de crecimiento y de la manipulación experimental fueron estrictas para disminuir al máximo la contaminación de los materiales.

6.3 CULTIVO *IN VITRO*

6.3.1 Etapa I. Iniciación. En esta etapa se consideró el tiempo aproximado de un mes para romper la latencia o dormancia, continuando con los siguientes procesos:



Figura 2. Técnica de extracción de ápices caulinares de *Allium sativum* L. var. peruana para la propagación *in vitro*.

A. Termoterapia

Se procedió a colocar el material vegetal en la incubadora, controlando la temperatura de la siguiente forma: un preacondicionamiento inicial de siete días a 30°C; 14 días a 36°C y 21 días a 38°C, con el objeto de erradicar los virus. (Walkey, et al., 1987)

B. Desinfestación de explantes

A los dientes de ajo sometidos a termoterapia, se les realizaron un corte transversal, la mitad superior se eliminó; para la esterilización, la parte inferior se lava en agua más jabón desinfectante con tres gotas de tween 20 e hipoclorito de sodio NaOCl 5% en agitación continua durante 15 minutos, posteriormente se trasladaron a la cámara de flujo laminar y se llevó a cabo la activación de explantes (Chagüendo, 1999).

C. Desinfección de explantes

Se lavaron en agua destilada todos los ápices por cinco veces y se colocaron en una solución de etanol al 70% durante un minuto, luego se trasladaron a una solución de hipoclorito de sodio al 3% más tres gotas de tween 20 con agitación continua, finalmente se lavaron con agua destilada estéril.

D. Incubación

El tamaño del ápice caulinar para la incubación se tuvo en cuenta que exhibiera una talla de 8 mm y se sembró en el medio de cultivo MS (Murashige-Skoog, 1962) con 20 ml de medio por frasco (figura 3), más los fitorreguladores de desarrollo: KIN + AIA (0.1 mg/L) con las siguientes condiciones: fotoperiodo 16 horas, temperatura 24-30°C, intensidad lumínica de 298-762 lux y una humedad relativa del 67%, por un periodo de tiempo de seis semanas.



Figura 3. Incubación de ápices caulinares de *Allium sativum* L. var. peruana en el medio MS.

6.3.2 Etapa II. Microbulbificación. Se obtuvieron plántulas libres de bacterias y hongos (figura 4), posteriormente se escindieron las hojas apicales de mayor tamaño, luego se llevaron a un medio de bulbificación (Racca et al., 1989), el cual estaba compuesto por MS (20 ml de medio por frasco), más los fitorreguladores de desarrollo: 2 ip "2 dimetil Allil Amino Purina (3.0 mg/L) mas ANA (0.3 mg/L), conservando las condiciones de fotoperiodo a 16 horas, temperatura 24-30°C, intensidad lumínica de 298-762 lux y una humedad relativa del 67%, por un período de seis semanas (Chagüendo, 1999).

El protocolo de desinfectación y desinfección tiene como referente el trabajo de investigación realizado por Tobar (1997), citado por Chagüendo (1999).



Figura 4. Plántulas de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro*.

6.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó el medio MS (Murashige-Skoog, 1962) adaptado en la Universidad Católica de Oriente. Este medio ha tenido gran aceptación debido a las concentraciones de macroelementos y microelementos tanto orgánicos e inorgánicos (tabla 1).

COMPUESTOS INORGÁNICOS

ml / L MEDIO		REACTIVO	g / 100 ml
Sol. Madre	ml/ L		
A	20	NH ₄ NO ₃	8.25
B	20	KNO ₃	9.5
C	5	H ₃ BO ₃	0.124
		KH ₂ PO ₄	3.4
		KI	0.0166
		NaMoO ₄ - 2H ₂ O	0.005
		CoCl ₂ - 6H ₂ O	0.0005
D	5	CaCl ₂ - 2H ₂ O	8.8
E	5	MgSO ₄ - 7H ₂ O	7.4
		MnSO ₄ - 4H ₂ O	0.338
		ZnSO ₄ - 7H ₂ O	0.172
		CuSO ₄	0.0004
F	5	Na EDTA	0.745
		FeSO ₄ - 7H ₂ O	0.557

COMPUESTOS ORGÁNICOS

SOLUCION MADRE DE VITAMINAS

REACTIVO	g / 100 ml	CANTIDAD A UTILIZAR
Acido Nicotínico	0.005	10 ml / L
Piridoxina	0.005	
Glicina	0.002	
Tiamina	0.01	

OTRAS SOLUCIONES MADRE

REACTIVO	g / s/n	CANTIDAD A UTILIZAR
Ácido cítrico	0.075g / 500 ml	10 ml / L
Inositol	0.5 g / 50 ml	10 ml / L

REACTIVOS BÁSICOS

REACTIVO	g /L
Agar-agar	7
Sacarosa	30

FITOHORMONAS

FITOREGULADORES DE DESARROLLO	CONCENTRACION
Cinetina (KIN)	0.1 mg / L
AIA	0.1 mg / L
2 ip	3.0 mg / L
ANA	0.3 mg / L

Tabla 1. Componentes orgánicos e inorgánicos del medio MS utilizado para las etapas de iniciación y microbulbificación de *Allium sativum* L. var. peruana.

6.5 CULTIVO EX VITRO

6.5.1 Etapa de aclimatación o preadaptación. Para el cultivo de ajo fue necesario contar con un invernadero. Dicho transplante se hizo en condiciones de suelo que contenía una mezcla de suelo y arena en proporción de 1: 1, sustrato previamente esterilizado y humedecido con agua. Esta operación se hizo con anticipación para asegurarse de tener la humedad adecuada por un periodo de cuatro semanas. Luego se llevaron directamente al campo; para ello deberán tener como mínimo de 10 a 15 cm de altura y tres hojas bien desarrolladas (Chagüendo, 1999).

6.6 ETAPA DE CAMPO

Antes de sembrar se preparó el terreno para la desinfección, utilizando fungicidas, insecticidas y bactericidas (Agrodyne, Curater, Benopoint, Vitavax y Cipermethina en proporciones de concentración 3 ml/L.), para evitar el ataque de patógenos que puedan deteriorar el cultivo. También se realizó un análisis completo de suelo, en el laboratorio de la Secretaría de Agricultura y Ganadería del Cauca, para el tratamiento de la fertilización (anexo 1).

Una vez obtenidas las plántulas de *Allium sativum* L. Var. peruana mediante propagación *in vitro* se sembraron en campo, en el Jardín Botánico “Álvaro José Negret” de la Universidad del Cauca, ubicado en la vereda La Rejoya al norte del área urbana de Popayán, a una altura de 1780 m.s.n.m. El espacio donde se llevó a cabo la siembra fue de 30 m², con 22 eras de 7 metros de largo por 1.20 metros de ancho.

En la presente investigación se trabajó con un total de 748 dientes de ajo, repartidas en 374 para la propagación *in vitro* y 374 para la propagación vegetativa. El experimento se hizo con un Diseño de Bloques Completos Aleatorizados. Se incluyó un total de 11 bloques (figura 5); es decir que cada tratamiento estuvo 11 veces repetido. Los tratamientos se aleatorizaron en las dos unidades experimentales o eras de cada bloque. La unidad de muestreo fue cada planta, de las cuales, por parcela y en forma aleatoria, se evaluaron cada mes hasta el final del experimento (cosecha o producción)

El experimento incluye una variable independiente o factor de tipo cualitativo que es la forma de propagación: la propagación *in vitro* (P.I.) y propagación vegetativa (P.V.); las variables dependientes son: altura de la planta, número de hojas, diámetro del bulbo, número de dientes, peso del bulbo y enraizamiento como indicadores de productividad. Para el análisis estadístico se hizo una estadística descriptiva, la prueba t student para variables paramétricas y la prueba de U de Mann-Whitney para las no paramétricas.



Figura 5. Diseño de parcelas de estudio para *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.

7. RESULTADOS

En ésta etapa se sembraron 374 ápices de las cuales el 15% se contaminaron; en la etapa II Microbulbificación se sembraron 316 plántulas obtenidas en la etapa de iniciación con un 2.5% de contaminación; en el cultivo *Ex vitro*, en la etapa III “aclimatación o preadaptación” se sembraron 308 plántulas provenientes de la etapa de Microbulbificación (figura 6) con un 60.06% de plántulas que se adaptaron y finalmente en la etapa IV “campo” se sembraron 185 plantas provenientes de la preadaptación, de las cuales se adaptaron un 46.49%. El porcentaje global de plantas que se desarrollaron mediante propagación *In vitro* fue de un 22.9% (Cuadro 1, 2 y 3).

7.1 CULTIVO *IN VITRO*

	No de ápices	% contaminación
Etapa de Iniciación	374	15.51
Etapa de microbulbificación	316	2.53

Cuadro No 1. Contaminación de *Allium sativum* L. var. peruana obtenida mediante cultivo *In vitro* en las etapas de Iniciación y microbulbificación.



Figura 6. Plántulas de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante cultivo *In vitro*, etapa microbulbificación.

7.2 CULTIVO *EX VITRO*

	Plántulas	% adaptación
Etapa de aclimatación	308	60.06
Etapa de campo	185	46.49

Cuadro No 2. Adaptación de plántulas *Allium sativum* L. var. peruana, cultivo *ex vitro* en las etapas de aclimatación y campo.

	% global de adaptación y desarrollo
Propagación <i>In Vitro</i>	22.99
Propagación vegetativa	83.99

Cuadro No 3. Adaptación y desarrollo global de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas por propagación *In vitro* y vegetativa.

Las plantas obtenidas por propagación *In vitro* y su rendimiento en términos de producción es significativamente menor (cuadro 3), ya que éstas durante su proceso de desarrollo, presentó un problema con la intensidad lumínica en la cámara de crecimiento, con un valor menor de 1000 lux, ya que éste es un factor importante en el proceso de la fotosíntesis y del desarrollo general fisiológico de las plantas, por lo tanto, las que estuvieron expuestas a baja intensidad lumínica no desarrollaron microbulbillos bien definidos y no lograron adaptarse a la etapa de aclimatación y de campo. Las plantas obtenidas *In vitro* se caracterizaron por su calidad fitosanitaria, demostrando la gran ventaja de éste método de propagación cuando se compara con los convencionales (figura 7).



Figura 7. Plantas de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *In vitro*.

7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.3.1 Evaluación de la productividad de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidos por propagación vegetativa e *In vitro*.

Los datos obtenidos de la evaluación de la productividad del ajo (*Allium sativum* L. Var .Peruana) obtenidos por propagación vegetativa e *In vitro*, se sometieron a prueba de t student para las variables paramétricas y para las pruebas de significancia estadística, se empleó la prueba estadística no paramétrico de U de Mann-Whitney (cuadro 4 y 5).

Tratamientos	Peso	No hojas	Enraizamiento	No dientes	Talla	Diámetro del bulbo
	X ± EE (n)*	X ± EE (n)*	X ± EE (n) *	X ± EE (n)*	X ± EE (n)*	X ± EE (n)*
Propagación vegetativa	54.2 ± 11.77 (48)	8.48 ± 0.12 (48)	15.21 ± 0.28 (48)	8.75 ± 0.26 (48)	52.40 ± 0.94 (48)	4.73 ± 0.61 (48)
Propagación <i>In vitro</i>	18.63 ± 1.01 (48)	6.54 ± 0.22 (48)	11.27 ± 0.29 (48)	4.75 ± 0.15 (48)	37.85 ± 0.52 (48)	3.12 ± 0.50 (48)
P	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000***	0.000***

Cuadro No 4. Análisis estadística descriptiva de la productividad de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas por propagación *in vitro* y vegetativa.

- * Índice Promedio (X) con su Error Estándar (EE) (n= tamaño de muestra).
- ** Prueba de significancia estadística no paramétrica de U de Mann-Whitney (P < 0.05).
- *** Prueba paramétrica de t de students para muestras independientes de Shapiro-wilk.

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
TALLA (Cm)	Se han asumido varianzas iguales	9.391	.003	13.605	94	.000	14.5417	1.06887	12.41939	16.66394
	No se han asumido varianzas iguales			13.605	73.305	.000	14.5417	1.06887	12.41155	16.67178
DIAMETRO DEL BULBO (Cm)	Se han asumido varianzas iguales	1.400	.240	20.503	94	.000	1.6142	.07873	1.45785	1.77049
	No se han asumido varianzas iguales			20.503	90.896	.000	1.6142	.07873	1.45778	1.77056

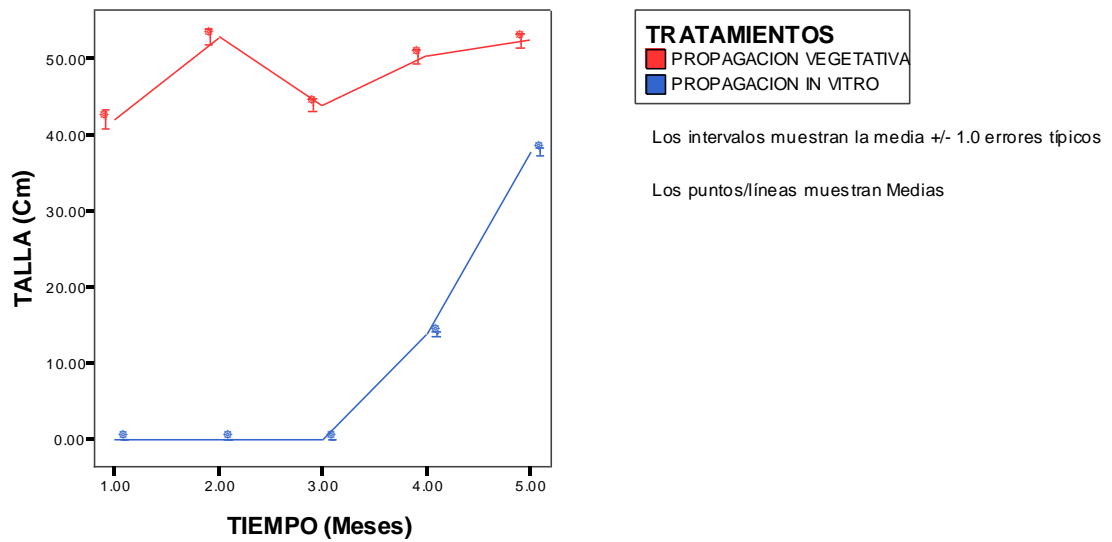
Cuadro 5. Prueba t student para muestras independientes de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas por propagación *in vitro* y vegetativa.

Para el análisis estadístico se realizó la evaluación a tiempo de cosecha, porque se dificultó la valoración mes por mes como lo estaba planteado, las plantas propagadas de manera vegetativa culminó primero su ciclo de desarrollo, en comparación, con las propagadas *In vitro*,

En los cuadro 6 y 7 se muestra el análisis estadístico descriptivo de los tratamientos de la propagación vegetativa y de la propagación *In vitro*. Las variables que se evaluaron fueron: el peso, números de hojas, enraizamiento, números de dientes, talla y diámetro de bulbo, la cual, a cada uno, se analizó su respectivo Índice de Promedio (X) y Error Estándar (EE), con un tamaño de muestra de n= 48, observándose la superioridad de la propagación vegetativa en todas las variables, en comparación con las de propagación *In vitro*. Las variables de peso, números de hojas, enraizamiento y número de dientes, no cumplen con la prueba de la curva normal y homogeneidad de varianza, es decir, que no

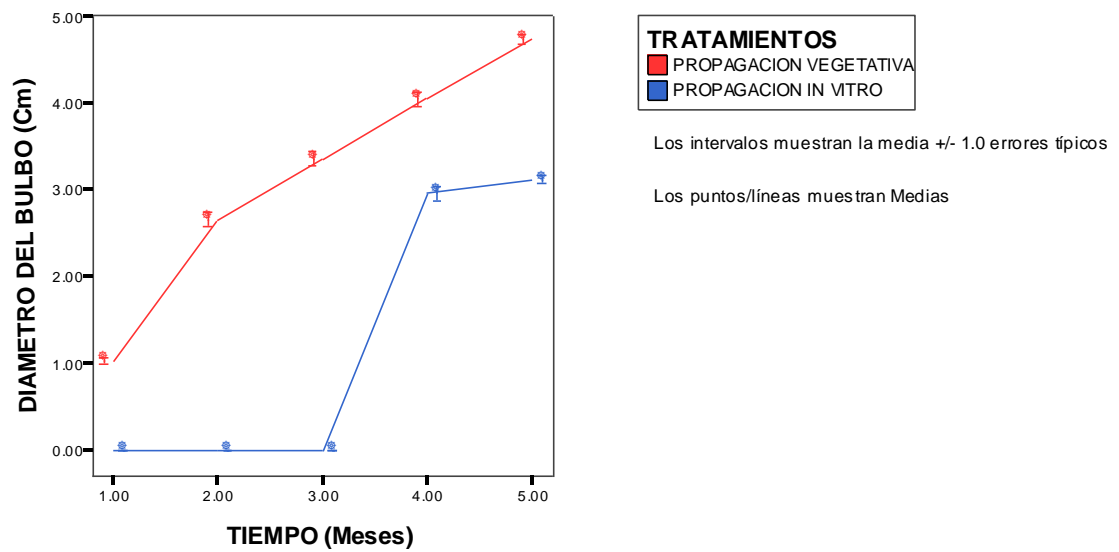
existen diferencias significativas entre ellas; por lo tanto, se aplicó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney con una altísima significancia estadística ($p < 0.000$). La altura y el diámetro del bulbo, son variables que se acomodan a la curva normal, por lo tanto son paramétricas y presentan homogeneidad de varianza, para éste análisis estadístico se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-wilk ($p > 0.05$) para muestras no significativas estadísticamente. Para el análisis de varianza se consideran que las muestras sean independientes, para verificar si pertenecen a una población. No cumplen con la homogeneidad de varianza: el altura, peso, número de hojas, número de dientes, porque existen diferencias significativas entre ellas. Para la talla, se utilizó la prueba t de students para dos muestras independientes, varianza desiguales, con una significancia de $p < 0.003$ (según la prueba de Levene), demostrando una altísima significancia estadística, el valor de la prueba es de 13.605; para el diámetro del bulbo, se utilizó la prueba t de students para dos muestras independientes, varianza iguales, es decir, que no existen diferencias significativas entre ellas, con una significancia de $p < 0.240$, demostrando la no significancia estadística (según la prueba de Levene), el valor de la prueba es de 20.503.

Figura 8. Evaluación de la talla de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.



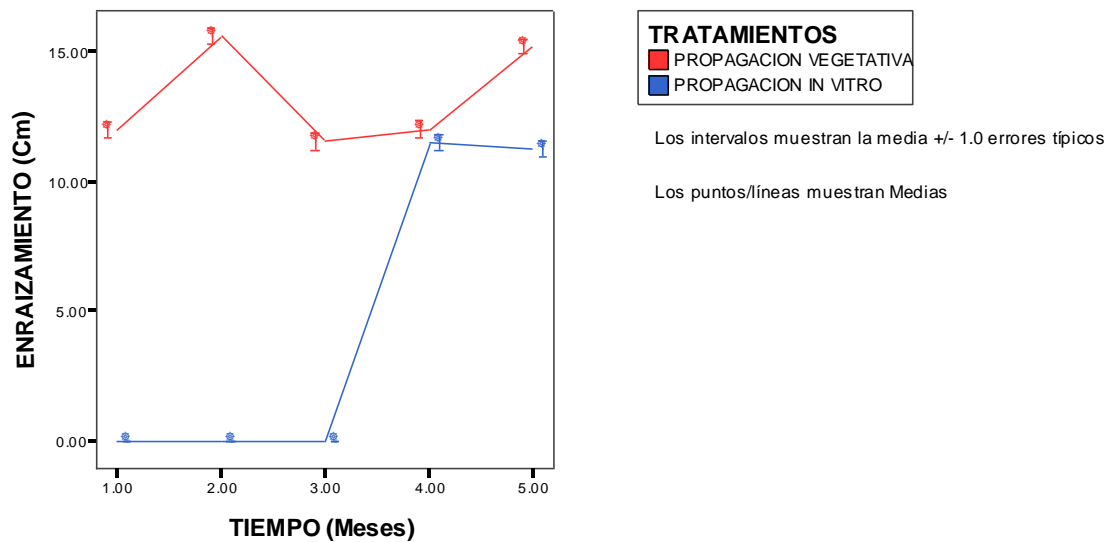
En la figura 8, se observa los resultados que se obtuvieron de la talla por propagación *in vitro* y vegetativa, mostrando una gran diferencia significativa de la propagación vegetativa sobre la *in vitro* durante su proceso de desarrollo.

Figura 9. Evaluación del diámetro de bulbo de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.



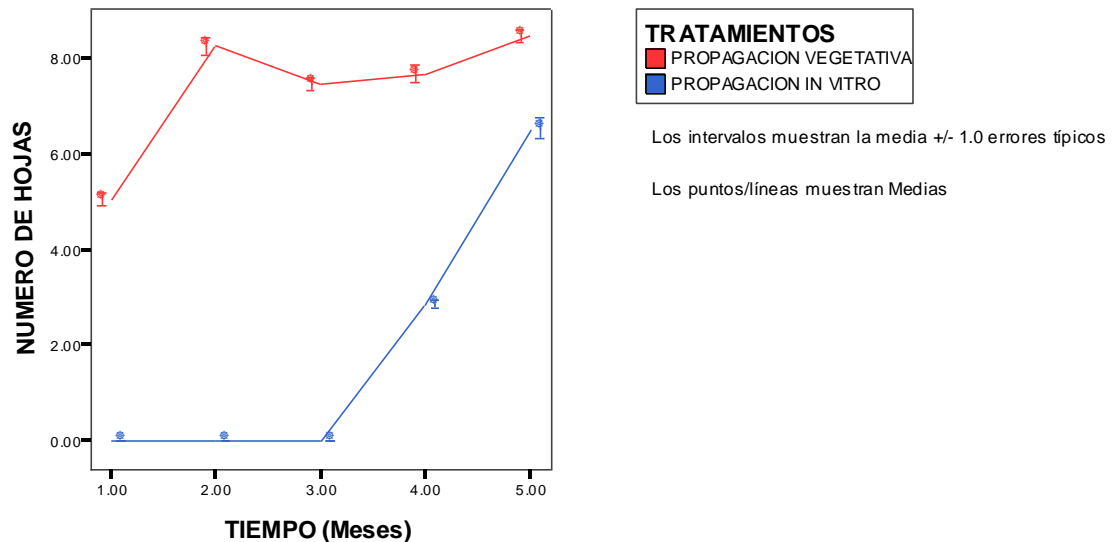
En la figura 9, se observa los resultados que se obtuvieron del diámetro de bulbo por propagación *in vitro* y vegetativa, mostrando una gran diferencia significativa de la propagación vegetativa sobre la *in vitro* durante su proceso de desarrollo.

Figura 10. Evaluación del enraizamiento de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.



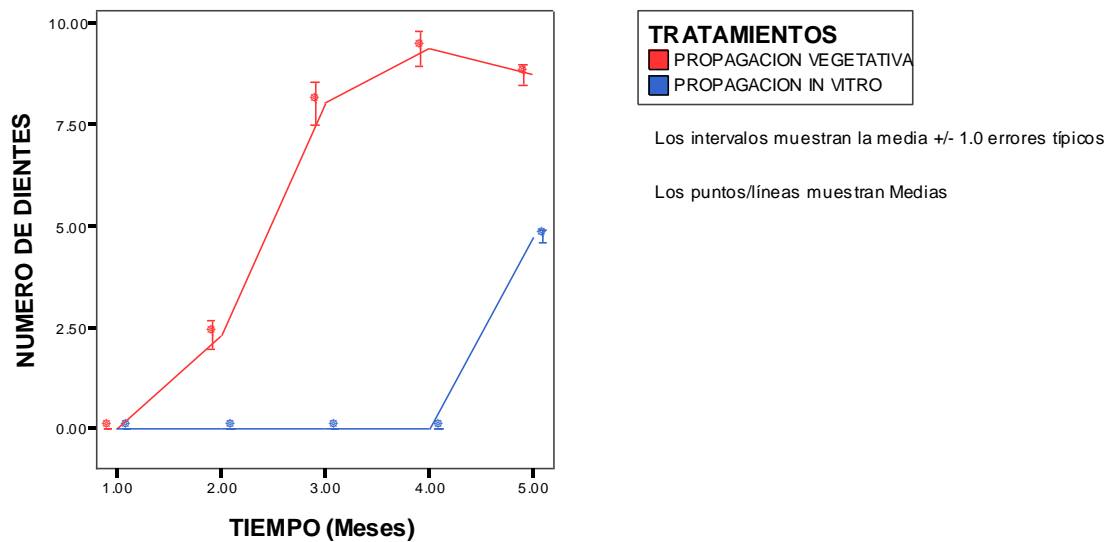
En la figura 10, se observa los resultados que se obtuvieron del enraizamiento por propagación *in vitro* y vegetativa mostrando una gran diferencia hasta cuarto mes, alcanzando su máximo desarrollo de elongación radicular y en el quinto mes se observa el incremento radicular para la propagación vegetativa y la decadencia para las *in vitro*, debido a las condiciones ambientales que se encontraban.

Figura 11. Evaluación del número de hojas de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.



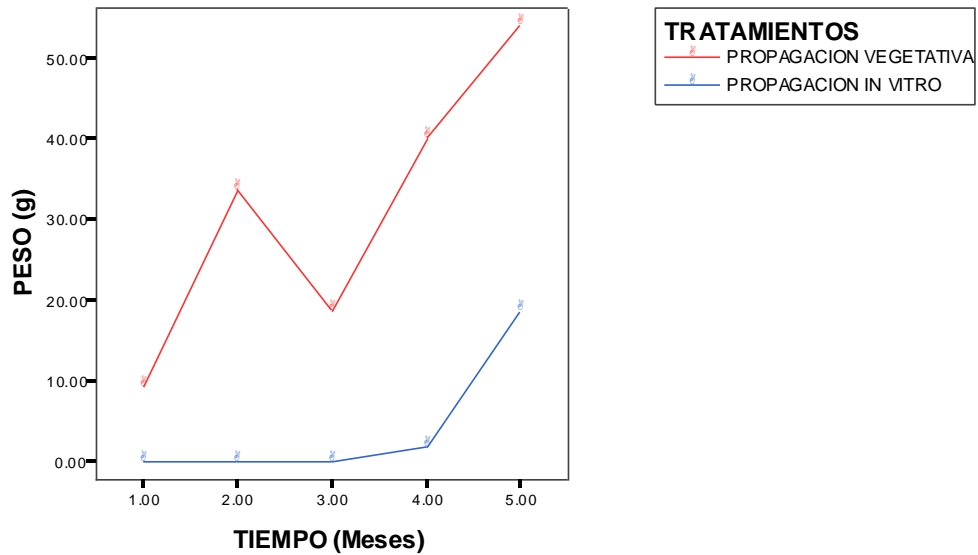
En la figura 11, se observa los resultados que se obtuvieron del número de hojas por propagación *in vitro* y vegetativa, mostrando una gran diferencia significativa de la propagación vegetativa sobre la *in vitro* durante su proceso de desarrollo. Para la propagación vegetativa se aprecia que a partir del segundo mes alcanza el número máximo de hojas desarrolladas, en cambio, para las *in vitro* solo se expresaron al quinto mes (cosecha).

Figura 12. Evaluación del número de dientes de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.



En la figura 12, se observa los resultados que se obtuvieron del número de dientes por propagación *in vitro* y vegetativa, mostrando una gran diferencia significativa para ambas propagaciones. Para la propagación *In vitro* presentan diferenciación y desarrollo de dientes a partir de los meses cuarto y quinto, al contrario sucede con la vegetativa, que empezaron a expresarse al segundo mes.

Figura 13. Evaluación del peso fresco de *Allium sativum* L. var. peruana obtenidas mediante propagación *in vitro* y vegetativa.



En la figura 13, se observa que la propagación vegetativa presenta diferencia significativa de peso fresco en comparación con la *in vitro*. La propagación vegetativa demuestra el descenso a partir del segundo y tercer mes, volviendo a incrementarse en el tercer mes cuando las condiciones ambientales se mejoraron, caso similar sucede con las *in vitro* observándose el ascenso del peso a partir del tercer mes hasta la cosecha.

8. DISCUSIÓN

La producción del ajo (*Allium sativum* L.) presenta una alta rentabilidad para los agricultores, pero no se ha logrado sacar mayor provecho por el mal manejo de la selección de la semilla, por la escasa o casi nula fertilización edáfica y rotación de cultivos (Wilkins y Doods 1983; Espinoza *et al.*, 1986). La problemática que enfrenta la semilla de ajo a nivel de calidad, permite que los resultados de este trabajo de investigación incida para que sean utilizadas nuevas técnicas como la biotecnología vegetal, que abarca unas series de técnicas, entre las que se encuentran el cultivo de tejidos vegetales *In vitro*, que se ha convertido una valiosa herramienta para la obtención de plantas sanas, libres de patógenos.

En la práctica es muy costoso y a veces imposible inspeccionar el 100% de la producción, de aquí la importancia de la investigación del cultivo *In vitro* como *Ex vitro*, donde se brindan las posibilidades de tomar decisiones muy confiables sobre la calidad de un producto. Para el desarrollo exitoso de ésta técnica debe ser muy estricto el cumplimiento de cada etapa o fase, desde la selección y clasificación del material vegetal, preparación del explante hasta la aclimatación de las vitroplantas.

Unos de los aspectos que se intentó considerar para el desarrollo del trabajo fue someter los dientes de ajo al proceso de vernalización a 4°C, para inducir la ruptura de la dormancia y de ésta manera activar su metabolismo germinativo. El almacenamiento en frío produce mayor velocidad y uniformidad de emergencia, desarrollo más rápido del área foliar, adelanto de la bulbificación y emisión de escapos, entrega anticipada del cultivo, como respuestas más uniformes. Mann (1952) comprobó que las bajas temperaturas provocarían la acumulación de citocininas durante el almacenamiento y éstas acelerarían el proceso de brotación.

El otro procedimiento es la erradicación de virus por medio de la técnica de termoterapia, sometiendo el material vegetal a la incubadora, controlando la temperatura de la siguiente forma: un preacondicionamiento inicial de siete días a 30°C; 14 días a 36°C y 21 días a 38°C Walkey *et al.*, 1987, citado por Chagüendo (1999).

El trabajo se dirigió fundamentalmente a evaluar la producción y productividad del ajo (*Allium sativum* L. var. peruana), obtenidas por propagación *In vitro* y su comparación con el ajo producido por propagación vegetativa. Los logros que se alcanzaron para éste trabajo es adaptar las plántulas obtenidas *In vitro* a la etapa *Ex vitro*, específicamente al campo, para luego evaluar su producción y los parámetros básicos de biometría, como indicadores de productividad. El primer logro fue obtener plántulas libres de contaminación (virus, bacterias y hongos) en el establecimiento del cultivo *In vitro*, en las etapas de iniciación y microbulbificación. En la etapa de iniciación se presentó un porcentaje de contaminación del 15%, dato relativamente viable, ya que los explantes se incubaron en frascos con medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) de cuatro a cinco explantes por frasco, por tal razón el riesgo de contaminación se ve reflejada. El éxito para ésta etapa es obtener el material vegetal sano y sin daños mecánicos, generalmente se emplean plantas vigorosas y dentro de éstas, las zonas que se encuentran en multiplicación celular activa, como los meristemas. Las plantas jóvenes son las que aportan los explantes mas reactivos, ya que la potencialidad disminuye con la edad y el tamaño del explante (Mroginski, 1991).

Para el establecimiento del cultivo *In vitro*, los explantes obtenidos, se le hizo una minuciosa desinfestación y desinfección para evitar la proliferación y el ataque de microorganismos patógenos, que provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos. Existen

formas para controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que lo introducen (Gómez, 1992).

Para este trabajo se utilizó el protocolo de desinfestación y desinfección como referencia del trabajo de grado de investigación de Chagüendo (1999). Para la Desinfestación se utilizaron solución jabonosa de tween 20 mas NaOCl 5% por un periodo de tiempo de 15 minutos; para la desinfección de ápices, se utilizaron etanol 70% por un minuto y NaClO 1% mas tween 20 en agitación continua (3-5 minutos) y finalmente se lavaron en agua destilada estéril. Los autores Margara (1998) y Jiménez (1998) utilizaron los mismos componentes químicos para los procesos de desinfestación y desinfección contribuyendo a la reducción de contaminación por microorganismos patógenos.

Para el cultivo *In vitro* , en las etapas de iniciación y microbulbificación, se utilizó el medio MS enriquecido con fitorreguladores de Auxinas y Citocininas, que ofrece una excelente alternativa para el cultivo de ápices caulinares como lo ha demostrado (Gamborg, 1968; Dunstan y Short, 1977) citados por Mroginski (1991); Jiménez (1998) y Luciani (1998). Los fitorreguladores que se utilizaron para la etapa de iniciación fue la KIN+AIA (0.1 mg/L), y para la microbulbificación el 2ip (3.0 mg/L) + ANA (0.3 mg/L), éstas combinaciones y concentraciones fueron utilizados con éxito en el trabajo de investigación de Chagüendo (1999), que contribuyeron al desarrollo de acuerdo con los resultados.

El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales en proporción y dosis específicas (Smith y Street, 1992). Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como el pH del medio y del agente solidificante (Margara, 1998).

Para el cultivo de meristemas y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio MS basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado en la mayoría de las especies propagadas *In vitro*. También se han empleado pero en menor frecuencia el Wh (White), B5 (Gamborg) y BDS (Dunstan y Short) (Mroginski, 1991; Jiménez, 1998; Luciani, 1998).

Los fitorreguladores en pequeñas cantidades aumentan, inhiben o modifican de una u otra forma cualquier proceso fisiológico del vegetal (Pérez, 1994). Un balance apropiado entre Auxina y Citocininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de Auxinas y Citocininas presentes en el explante, las cuales depende de la especie y del tipo de explante. Se considera que si la relación Auxina/Citocinina en el medio de cultivo es favorable a la segunda, se favorece la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Smith, 1992; Dixon, 1994; Jiménez, 1998). Usualmente en los meristemas y ápice la Citocinina endógena es bajo debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adicción exógena de Citocininas en los medios de establecimiento es generalizada, se utilizan en el medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0.03-30 mg/L y se ha demostrado su efecto en el crecimiento y morfogénesis *In vitro* (Mroginski, 1991; Dixon, 1994).

Al contrario suceden con las Auxinas, ya que las zonas de desarrollo activo, los ápices y meristemas que se emplean como material inicial para el cultivo *In vitro*, son los lugares de síntesis, se adicionan al medio de cultivo a concentraciones que oscilan en 0.001-10 mg/L (Krikorian, 1991; Jiménez, 1998).

Las condiciones ambientales que se establecieron en el cultivo *In vitro*, para las etapas de iniciación y microbulbificación fueron suministrados en ambientes controlados; por lo menos en lo que se refiere a la luz, temperatura, humedad relativa y fotoperiodo. Los explantes permitieron regenerar plantas pocas vigorosas, ya que en la cámara de crecimiento, presentó un daño, en unas de las lámparas que le proporcionaba fuente luminosa, registrando intensidades lumínicas menores de 1000 lux, por lo cual, sus procesos fotosintéticos se vieron reflejados a las respuestas morfogénéticas; caso contrario, de los explantes que alcanzó relativamente proyectar una buena intensidad lumínica, mostrando plántulas bien verdes y vigorosas en la etapa de iniciación; para la microbulbificación, se obtuvieron microbulbillos diferenciados, lo cual logró adaptarse al cultivo *ex vitro*, hasta la etapa final de campo con éxito.

Las condiciones ambientales de incubación es un requisito que se debe cumplir rigurosamente para el éxito en el establecimiento de los cultivo *In vitro*. Para ello es conveniente que los explantes se incuben en ambientes controlados de luz (1000-5000 lux) y temperatura (20-28°C), así como la humedad relativa (70-80%) acordes con los objetivos de trabajo. Estos efectos influyen prácticamente en todos los tipos de procesos: absorción de agua, transpiración, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, entre otros (Pierik, 1990; Roca, 1991). No obstante, se debe tener en cuenta que cada cultivo tiene sus propias especificidades.

Una vez culminado la etapa de microbulbificación, los microbulbillos obtenidos, se transplantaron al cultivo *ex vitro*, en las etapas de aclimatación o preadaptación y campo. Para la etapa de preadaptación, el porcentaje de plántulas que se adaptaron fue un 60.06%, dato relativamente viable, en comparación con los resultados obtenidos por Bhojwani (1980), quien evaluó el comportamiento *In vitro* del clon de ajo francés "Rose de Kakylys" previamente saneado de virus,

reportando una adaptación de las vitroplantas a la etapa de preadaptación, utilizando un sustrato pumita: turba (4:1), pero sólo poco más del 50% logró sobrevivir. Posteriormente Walkey *et al.*, (1987) obtienen plantas de *Allium sativum* y *Allium ascalonicum* libres de virus por cultivo de ápices caulinares o meristemas, pero las pérdidas fueron superiores al 70% cuando se transfirieron las plántulas propagadas *In vitro* directamente al suelo. Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación, las plántulas que no se adaptaron, se debió porque éstas no desarrollaron bulbo y un sistema radical necesarios para su protección, lo que pudo conllevar a desecación en los días posteriores al transplante a suelo. Otro factor que influyó en el desarrollo fue las condiciones ambientales del invernadero, por no contar condiciones controladas de temperatura, registrando temperaturas máximas de 46 ° C y una mínima de 14 ° C; alterando la hidratación de las plantas.

El mayor obstáculo para el establecimiento de las plántulas que se obtienen por métodos *In vitro* es usualmente la transición del cultivo aséptico a la preadaptación y a condiciones de campo (Novak, 1980), por lo que ésta etapa reviste una gran importancia. En ella se realiza el transplante de las plántulas al suelo y su posterior adaptación al medio ambiente. Para lograr un alto índice de sobrevivencia se necesita que las plantas tengan un sistema radical bien desarrollado y una alta humedad, necesaria para su protección lo que evita su desecación en los días posteriores al transplante al suelo. Los resultados obtenidos en la etapa de campo, expresaron porcentaje de plantas relativamente bajo, porque solo sobrevivieron aquellas plantas que presentaron un buen desarrollo del bulbillo y del sistema radical, como lo manifestó Novak (1980). Las plantas que se adaptaron a campo a pesar que durante su proceso de desarrollo, el clima se encontraba en un período de tiempo seco, con temperaturas máxima de 36°C y una mínima de 25°C, humedad relativa de 50-60% que afectaron al desarrollo de la bulbificación, pero el material vegetal obtenido es de alta calidad

biológica, libres de patógenos y de plaguicidas. Según García (1998) una vez instalada la bulbificación, el crecimiento de las hojas de reserva, las cuales originan los dientes, requiere temperaturas entre 17 y 26°C. Temperaturas inferiores a 9°C retardan mucho el proceso y superiores a 28°C lo inhiben. A medida que aumenta el fotoperiodo, más rápido es el crecimiento de los dientes y más temprana es la maduración de los mismos.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la producción y productividad del ajo, por propagación *In vitro* y vegetativa, se observaron claramente la gran diferencia significativa de las plantas obtenidas por propagación vegetativa, demostrando que se puede cultivar en estas zonas climáticas, ya que éstas son de clima templado a frío, pero hay que estar muy pendiente en las labores culturales, principalmente en el sistema de riego, control de plagas y de arvenses. Para las plantas obtenidas *In vitro*, tienen la gran ventaja que se racionaliza el uso de plaguicidas, ya que no fue necesario su uso y a la hora de cosechar presentó un buen material vegetal sano, libre de patógenos, considerando que la biotecnología vegetal es una gran herramienta para obtener material vegetal de alta calidad biológica y poder establecer un banco de germoplasma para su preservación y comercialización de la semilla.

9. CONCLUSIONES

Se logró obtener plantas de ajo (*Allium sativum* L. var. peruana) por propagación *In vitro* y propagación vegetativa, en unas condiciones climáticas no propias de estas especies, ya que éstas son de clima frío y/o templado.

El procedimiento establecido se presenta como mejor resultado, en términos de producción, la propagación vegetativa, con un porcentaje de adaptación y desarrollo de un 83.99%, en comparación con las plantas obtenidas *In vitro* con un 22.99%.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales *In vitro*, en las etapas de iniciación y microbulbificación, presentó un rendimiento de producción de plántulas relativamente bueno: en la etapa de iniciación no se adaptaron por contaminación de tipo bacteriano y de hongos un 15.51% y en la microbulbificación un porcentaje de 2.53%.

En el cultivo *Ex vitro* el porcentaje de adaptación 60.06% para la preadaptación y un 46.49% para campo.

Los análisis estadísticos de la evaluación de la productividad, permitió demostrar la superioridad de la propagación vegetativa en todas las variables, en comparación con las obtenidas *In vitro*, presentando diferencias significativas entre ellas, según la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney ($p < 0.000$).

La biotecnología vegetal, en especial el cultivo *In vitro* de tejidos vegetales es con respecto a las técnicas tradicionales, una herramienta más segura y eficiente para obtener material vegetal de alta calidad biológica.

10. RECOMENDACIONES

Para el establecimiento del cultivo *In vitro* y propagación vegetativa de *Allium sativum* L. var. peruana, es conveniente seleccionar el material vegetal saneado y someterlos a termoterapia para eliminar los virus y para activar su metabolismo germinativo con la vernalización.

Para los cultivos *In vitro* es importante tener en cuenta los protocolos de asepsia lo más detallado posible, para evitar problemas de contaminación por bacterias y hongos.

La utilización y manipulación de los explantes se debe tener en cuenta la destreza para extraer ápices caulinares y para incubarlos en los frascos con el medio de cultivo en el menor tiempo posible y así no exponerlos a contaminarse.

Para la etapa de preadaptación, es mejor sembrar plantas que presenten un buen desarrollo del bulbillo y del sistema radical, el sustrato estéril y fertilizado.

Para adaptarlos a campo, se recomienda seleccionar la época climática adecuada, que no presenten periodos largos de lluvia o de tiempo seco, el sustrato fertilizarlo según el análisis de suelo y que la textura sea franco arenosa para evitar encharcamiento y facilitar el drenaje, control oportuno de arvenses y aplicar riego en caso de necesidad.

La experiencia del trabajo permitió reconocer la alta calidad biológica de las plantas de ajo obtenidas *In vitro*, por eso sería bueno tener un banco de semillas, capacitar a los agricultores que conozca la técnica de cultivos *In vitro* de tejidos

vegetales, con el fin de reducir los patógenos que afectan el desarrollo de la planta y producir una semilla vegetativamente sana y por consiguiente establecer un banco de germoplasma para la conservación y comercialización de los microbulbillos.

11. BIBLIOGRAFÍA

ABIKO, W. and NISHI, Y. 1980. Studies on garlic mosaic. I. Causal virus. In: Bulletin OF the Veg. and Orn. Crops Res. St. Service A. 7: 139-147.

BENJAMÍN, H.S.; LAU, H.D y MOSES, A. 1983. Nutrit research. Vol. III.

BHOJWANI, M.W. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. Sci. Hortic. 13: 47-52.

BURBA, J.L. y MORICONI, D.N. 1991. Manejo integrado de bancos de germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.). En: Antecedentes Científicos en *Allium sativum* L. producidos en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. Editado por D.N. Moriconi. p. 157-171.

BURBA, J.L. 1992. Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum* L.) En: Producción, Poscosecha, Procesamiento y Comercialización de Ajo, Cebolla y Tomate. Santiago de Chile: FAO. p. 63-126.

CEVALLOS, A.M. 1998. Embriogénesis somática en el cultivo de Cafeto (*Coffea sp.*). Determinación de marcadores morfo-histológicos y bioquímicos. 1998. p. 16. Tesis (Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal). La Habana. INCA.

CHAGÜENDO, M. 1999. Evaluación de la etapa de Microbulbificación *in vitro* de *Allium sativum* L. var. Chileno rosado Obtenidos a Partir de Ápices Caulinares. Popayán. 1999. p. 26-43. Trabajo de Grado (Pregrado de Biología). Universidad del Cauca.

CONCI, V. et al., 1986. Cultivo de Meristemas Apicales de seis tipos Clonales de Ajo (*Allium sativum* L.) ϕ YTON. 46(2): 187-194.

CONCI, V.C. 1987. Regeneración de plantas de ajo libres de virus por termoterapia combinada por el cultivo de meristemas. En: Congreso Lat. De Fitopatología. 4°. Lima, Perú. p. 13.

CONCI, V. 1991. Virus del ajo. Diagnóstico y obtención de plantas libres. En: 1^{er} y 2^{do} Curso-Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de ajo. Argentina: INTA. p. 59-60.

CONCI, V; NOME, S.F y MORICONI, D. 1987. El ajo, origen del material élite.En: Italia, R.R. (Ed.). Ajo de Sanidad Controlada. Informe Técnico. (16). Argentina: INTA. p. 4-6.

DIXON, R.A. 1994. Plant cell culture. A practical approach / R.A. González. New York: IRL Press Oxford Univ. 230p.

DUNSTAN, D.I. and SHORT, K.C. 1977. *In vitro* studies on organogenesis and growth in *Allium cepa* tissue culture. In: Acta Hortic. 78: 139-148.

ENGELAND, R. 1996. Growing great garlic. 7. ed. Okanogan. Washington: Filaree Production. 213p.

ESPINOZA, N.O., et al. 1986. The potato: a model crop plant for tissue culture. In: Outlook of Agriculture. 15: 21-26.

ETHO, T. 1983. Germination of seeds obtained form a clone of garlic. Proc. Japan Acad. 59 (4): 83-87.

FAO. 1990. ANUARIO DE PRODUCCIÓN. Roma, Italia. 4. p. 192-193.

FAO. 1991. Intercambio y propagación de germoplasma de ajo a través de microbulbillos, Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias. 45p.

FAO: Anuario. 1997. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Volumen n.º 49. Roma.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. and OJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. In: Exp. Cell. Res.

GARCÍA A, Carlos R. 1998. El Ajo. Cultivo y aprovechamiento. 2 ed. España. 205p.

GIACONI, V. 1993. Cultivo de Hortalizas. / M. Escaff. 8. ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria: INIA. p. 93-103.

GÓMEZ, O. y SAVÓN, J. R. 1992. Estudio de parámetros genéticos en el ajo (*Allium sativum* L.). Agrotecnia de Cuba. 24 (3-4): 33-37.

GÓMEZ, O. 1992. Desinfección y saneamiento de la semilla de ajo para su establecimiento *in vitro*. Informe Técnico. INRA-Francia. 4h.

GÓMEZ, O.; DEPESTRE, T.; IZQUIERDO, H.; DISOTUAR, R.; VÁZQUEZ, C.; RAMÍREZ, S.; BEJERANO, M.; PERALTA, E. y DALMAU, E. 1993. Obtención de clones de ajos libres de virus por cultivo de meristemos. IIHLD-MINAG: 8º Forum de Ciencia y Técnica. 10 h.

HUANG, S.C. and MILLIKAN, D. 1977. Production of apple plantlets by tipo meristem culture. Trans. Mo. Acad. Sci. 10. 11: 279. (Abstract).

IZQUIERDO, H.; DISOTUAR, R.; GÓMEZ, O.; RAMÍREZ, S.; VASQUEZ, C.; BEJERANO, M.; PERALTA, E.; DEPESTRE, T. y DALMAU, E. 1995. Multiplicación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) en condiciones tropicales. Avances en Biotecnología Moderna 3. Ciudad de la Habana: CIGB. p. II. 20.

IZQUIERDO, H. 2000. Propagación *in vitro* de Genotipos Cubanos de Ajo (*Allium sativum* L.). 92 p. Tesis (Master en Biología Vegetal). Ciudad de la Habana. Universidad de la Habana. 2000.

JIMÉNEZ, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. p. 45-46. En: Pérez, J. (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara: IBP. 390p.

JIMÉNEZ, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. p. 13-24. En: Pérez, J. (Ed.) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara: IBP. 390p.

KOUL, A.K. y GOHIL, R.N. 1970. Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum* L. Citología. 35: 197-202.

KRIKORIAN, A.D. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca, M.N.y L.A. Mroginski (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura Tropical. Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CIAT. p. 41-77.

LEÓN, M. 1991. Estudio del régimen de riego, densidades de siembra y su influencia en la conservación de distintos clones de ajo. Informe Final de Etapa. Resultado 510.

LUCIANI, G.; MARINANGELI, P y CURVETTO, N. 1998. Cuvettocido traumática en la formación *in vitro* de brotes y bulbillos de ajo Colorado (*Allium sativum* L.). En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivos de Tejidos. Resumen. p. 147-148.

MANN, L.K. 1952. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. Hilgardia. 21 (8): 195-251.

MARGARA, J. 1998. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los Meristemas y la Organogénesis. Madrid: Ediciones Mundi Prensa. 232p.

MINAG. 1983. Instituto técnico del cultivo de ajo. Dirección Nacional de Cultivos Varios. 40 p.

MROGINSKI, L.A. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*/W.M. Roca. En: Roca, W.M. Y L.A. Mroginski (Eds.). Cultivos de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CIAT. p. 10-12.

MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15: 473-497.

NOVAK, F.J. 1990. *Allium* tissue culture. In: Rabino witch, H.D. y J.L. Brewster (Eds.). Onions and Allies Crops 1. Florida: CRC Press: Inc. Boca de Ratón. p. 234-250.

NOVAK, F.J. 1980. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 84: 250-260.

NOVAK, F.J. 1990. Plants tissue cultures techniques for mutation breeding. Viena: FAO / IAEA Press. 169 p.

PÉREZ, A.; FERNÁNDEZ, T. y ALONSO, J. 1998. El uso de quimioterapia y termoterapia en la implantación de meristemos *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.). *Avances en Biotecnología Moderna.* Ciudad de la Habana: CIGB. p. II. 21.

PÉREZ, G.F.I. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. / J.B. Martínez. España: Ediciones Mundi Prensa. 218p.

PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plántulas superiores. Madrid. p. 91-213.

RACCA, R.W. et al., 1989. Microbulbificación *in vitro* en ajos de sanidad controlada. En: Congreso Argentino de Horticultura, 12°. Santa Fe, Argentina. Resumen 48.

RACCA, R.W. 1989. La Microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada; un paso esencial en la transferencia a tierra. En: Curso / Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de Ajo, 1^{ro}. Argentina: INTA. p. 3-6.

RACCA, R.W.; LOSAN, A.; DE BILLERBECK, G.; CONCI, V. y BONGIORNO, O. 1989. Microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada. En: XII Reunión de la Sociedad Argentina de Horticultura. Resúmenes. p. 35.

ROCA, W. M. 1991. Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. /L.A. Mroginski. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CIAT. p. 2-17.

SANTANA, N.; MARTINEZ, O. y GONZÁLEZ, M. 1988. Embriogénesis somática en el cultivo de café (*Coffea arabica*) (Parte D). Cultivos Tropicales. 10(2): 36-43.

SAVÓN, J.R.; AYALA, A. y LORDANOV, D. 1987. Influencia de la distancia entre plantas y fechas de plantación sobre los rendimientos de ajo (*Allium sativum* L.). Ciencia y Técnica en la Agricultura. Hortalizas, papa, granos y fibras. 6 (2): 39-50.

SMITH, S.M. y STREET, H.E. 1992. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of cariot (*Daucus carota* L.) a serially subcultured. Ann. Bot. 38: 223-241.

STAHLSCHMIDT, O.M.; CAVAGNARO, J.B y BORGIO, R. 1997. Growth analysis of three garlic (*Allium sativum* L.) cultivars with differences in yield. En: Prensa Acta Horticulturae.

STAHLSCHMIDT, O.M.; CAVAGNARO, J.B y BORGIO, R. 1997. Influence of planting date and seed clove size and leaf area and yield of two garlic cultivars (*Allium sativum* L.) En: Prensa Acta Horticulturae.

TOBAR, M. 1997. Evaluación de los Efectos de Auxinas y Citocininas sobre el Desarrollo de Ápices Caulinares de *Allium sativum* L. var. Chileno rosado Cultivados *in vitro*. Popayán. 1997. Trabajo de Grado (Pregrado de Biología). Universidad del Cauca.

TRAUB, H.P. 1968. The subgenera, sections and subsections of *Allium*. Plant Lif. 24: 147-163.

VANDIJK, P; AHUJA, M.R. y VASIL, V. 1991. Plant tissue cultures in genetic and plant breeding. Advances in Genetics. 20: 127-215.

WALKEY, D.G.A. et al., 1987. Production of virus free garlic (*Allium sativum* L) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem tip culture. In: Journal of Horticultural Science. 62 (2): 211-220.

WALKEY, D.G.A; WEBB, M.J.W.; BOLLAND, C.J. y MILLER, A. 1987. Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) by meristem tip culture. Journal of Horticultural Science. 62 (2): 211-220.

WILKINS, C.P. and DODDS, J.H. 1983. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. In: Sci. Prog. Oxf. 68: 259-284.