

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
POSTGRADO EN AGRONOMÍA**

**METODOLOGÍA PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE SEMILLA DE AJO
(*Allium sativum* L.) LIBRE DE ENFERMEDADES, MEDIANTE CULTIVO DE
TEJIDOS.**

Ing. Agr. Eliana Torres Lozano

Maracay, 06 de Febrero de 2012

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una hortaliza muy valorada en la mesa venezolana. Pero a pesar de la importancia económica y social que posee esta especie en el país, su producción ha disminuido notablemente. La carencia de semillas certificadas para la siembra una de las principales causas de esta disminución. En el presente trabajo la propagación ha sido señalada en tres etapas: la primera parte se concentró en la determinación del mejor medio de cultivo para la obtención de plántulas; así como el tipo de explante ideal que permitiera acelerar y aumentar la tasa de multiplicación de brotes por explante; En la segunda etapa se determinaron los niveles óptimos de sacarosa para el desarrollo de microbulbillos y en una tercera etapa la aclimatización de meristemas de explantes de meristemo apical y discos de tallos, se logró en el medio microbulbillos bajo condiciones de invernadero. La iniciación de brotes Linsmaier y Skoog, 1965 (LS), sin reguladores de crecimiento. Las variables porcentaje de brotes y número de brotes/explante, mostraron los valores más altos para explantes de disco basal. La inducción de microbulbillos ocurrió en el tratamiento suplementado con 90 g l⁻¹, donde se lograron los mayores valores de diámetro ecuatorial, masa fresca y sobrevivencia bajo condiciones de invernadero. El proceso de obtención de semilla de ajo en condiciones *in vitro* ocurrió en un período de cuatro meses, con una eficiencia de tres plantas/explante.

Palabras claves: Producción de semilla, *Allium sativum* L., Cultivo de tejidos

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a highly prized vegetable in Venezuela. Despite the economic and social importance of this species, its production has declined markedly in this country, being the lack of certified seed for planting one of the main causes. In the present work micropropagation was done in three stages: the first part focused on determining the best culture medium for development of seedling, as well as the ideal explant type that would accelerate and increase the multiplication rate of shoots per explant and then determined the optimal levels of sucrose for the development of small bulbs that eventually could be handled and acclimatized under greenhouse conditions. Data were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test. The initiation of shoots from apical meristem and basal discs was achieved in LS medium (1965), without growth regulators. Highly significant differences were found between treatments for the variables percentage of shoots and number of shoots / explant, showing higher values for the basal discs. The induction of small bulbs occurred in the treatment supplemented with 90 g·L⁻¹sucrose, which achieved the highest values of equatorial diameter, fresh mass and survival under greenhouse conditions. The process of obtaining garlic seed *in vitro* conditions occurred in a period of 4 months.

Keywords: Seed production, *Allium sativum* L., micropropagation.

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una hortaliza muy valorada en la mesa venezolana. Es un cultivo ampliamente utilizado como producto fresco para la elaboración de comidas y salsas, así como en procesamiento industrial para la preparación de fármacos y condimentos. (Pardo y Marín, 2003). Debido a sus altos rendimientos, buenos precios del producto y mercado seguro, se considera rentable, lo que hace posible su producción en pequeñas superficies con resultados económicos satisfactorios para el productor (Molina, 2003). Las zonas de producción de ajo se concentran en los estados Mérida, Lara, Táchira y Trujillo (Román y Núñez, 2008).

A pesar de la importancia económica y social que posee esta especie, su producción en el país ha disminuido notablemente, siendo la carencia de semillas certificadas para la siembra una de las principales causas (Pardo y Marín, 2003). Al respecto, cabe destacar que la forma de propagación asexual o estrictamente apomíctica del ajo, ha dificultado la producción de semillas certificadas, por lo que los productores hacen uso de los dientes o bulbos de procedencia desconocida como única forma de propagación comercial del cultivo (Pardo *et al.*, 2009).

Entre los principales factores que han contribuido a la introducción de diversos clones en Venezuela están: 1) El productor no cuenta con más semilla que la propia o la de productores vecinos, por lo cual la pureza genética de dichos materiales se ha ido perdiendo con el tiempo. 2) La búsqueda de material genéticamente resistente debido a la presencia de enfermedades importantes. Actualmente la pudrición blanca, causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, ha ocasionado la sustitución casi total de la superficie sembrada por esta hortaliza, debido a pérdidas del producto comercial (bulbos) que pueden llegar al 100% (Moreno y Acevedo, 2002).

Es un cultivo de propagación netamente vegetativa, lo cual ha representado una limitación para su mejoramiento genético, ya que se hace imposible la realización de cruces para generar variabilidad. La obtención de cultivares se basa en la caracterización y selección de individuos idóneos para su posterior multiplicación en forma individual o masal. Pese a esta característica, el ajo es genéticamente variable, pues se encuentran clones bien diferenciados en cuanto a morfología, requerimientos, rendimientos y calidad (Molina, 2003). Por esta razón que es de vital importancia priorizar las áreas de la producción de semilla a escala nacional, puesto que la existente actualmente en el país viene contaminada y con baja calidad fitosanitaria.

Las técnicas de cultivo de tejidos permiten solucionar el problema fitosanitario, ya que favorecen la conservación de genotipos y la regeneración de materiales vegetales uniformes y libres de plagas y enfermedades. El cultivo de meristemas es un método comúnmente utilizado para la propagación clonal y para la erradicación de patógenos, en especial, hongos y virus en ajo (Sánchez, 1995). En este sentido Mohamed *et al.* (1994) y Sánchez (1995), reportaron una metodología para la inducción, regeneración y bulbificación de plantas *in vitro* de ajo a partir de ápices meristemáticos en medios Murashige y Skoog 1962 (MS) y Gamborg *et al.* 1968 (B5) respectivamente, en donde la tasa de multiplicación fue de 1:1, obteniendo un brote por explante.

En investigaciones posteriores Ayabe y Sumi (1998), establecieron una nueva metodología para la producción de plantas y bulbos semillas, a partir de discos basales, mediante el cual lograron un aumento de la tasa de multiplicación de 1:1 en metodologías anteriores a 1:25 en un medio Linsmaier y Skoog, 1965 (LS) libre de reguladores de crecimiento, siendo esta vía una herramienta útil para la producción masal de semilla de ajo libre de enfermedades.

En el presente trabajo se estableció una metodología para la propagación eficiente y masiva de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de enfermedades, utilizando como herramientas las técnicas de cultivo de tejidos. La investigación se concentró en la determinación del tipo de explante y medios de cultivo favorables para el desarrollo de clones de ajo (*Allium sativum* L.), libre de enfermedades que permitan un aumento de la tasa de multiplicación, evaluación de microbulbificación y supervivencia en condiciones de invernadero.

II. OBJETIVOS

Generales

- Obtener una metodología para la propagación masiva de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de enfermedades, mediante cultivo de tejidos.

Específicos

- Determinar el explante y medio de cultivo más favorable y eficiente para la obtención de semilla de ajo, para la regeneración de plantas libres de enfermedades mediante cultivo de tejidos.
- Evaluar la formación de brotes *in vitro* de ajo en explantes de ápices meristemáticos, utilizando tres medios de cultivo semi-sólidos (MS, LS, B5) libres de reguladores de crecimiento.
- Evaluar la formación de brotes *in vitro* de ajo en explantes de discos basales, utilizando tres medios de cultivo semi-sólidos (MS, LS, B5) libres de reguladores de crecimiento.
- Evaluar la formación de bulbos *in vitro* de ajo utilizando el medio LS, libre de reguladores de crecimiento, con tres concentraciones de sacarosa (30, 60,90%).
- Evaluar la aclimatización de bulbos de ajo bajo condiciones de invernadero.

III. REVISION DE LITERATURA

3.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO:

3.1.1. Origen

El ajo (*Allium sativum* L.) es originario de Asia Central, desde allí se extendió hacia el Este hasta alcanzar China y hacia el Oeste en dirección a Europa. El comercio europeo facilitó su distribución, lo que hizo del ajo un condimento básico en muchos alimentos. Desde épocas remotas ha sido considerado como un medicamento vegetal. Su consumo ha sido citado en textos de la época de los egipcios y la de los romanos, asociándolo como un alimento que daba mayor fuerza y vigor para la realización de trabajo físico. Durante la Edad Media fue utilizado como preventivo del cólera. Actualmente también se le considera por sus propiedades antisépticas, diuréticas, estimulantes de la secreción biliar y estomacal, vermífugo, vasodilatadores y por su efecto contra la arteriosclerosis y trombosis (Cardona y González, 2006).

Pascual (1997), cita a Vavilov (1887–1943), quien desarrolló la teoría de la existencia de genocentros o centros de origen de las plantas cultivadas quien señala, que el ajo procede del centro y sur de Asia (Centro Indo-Afganistano), desde donde se propagó al Mediterráneo y de ahí al resto del mundo. Se cultiva desde hace miles de años, y ya se consumía en India y en Egipto desde aproximadamente los 3.000 años A.C. Ya a fines del siglo XV, los españoles introdujeron al ajo en el continente americano.

3.1.2. Características botánicas

El ajo pertenece taxonómicamente a la familia de las Alliáceas subfamilia Alliaecae y es monocotiledónea, diploide, $2n=16$ (Burba, 2003).

Es una planta herbácea constituida por un bulbo subterráneo, formado por "dientes" unidos en su base alrededor del tallo verdadero y recubiertos por catáfilos blancos o morados, cuya tonalidad varía según la variedad y la altura del sitio de siembra (Ramos, 1991). Las hojas son alargadas, planas y envainadoras; las flores de color rosado o verde y no producen semillas. El falso tallo es blando, liso y de hasta 40 cm de longitud de donde nacen bulbillos aéreos. El sistema radical consta de numerosas raíces adventicias simples, delgadas y poco ramificadas que crecen superficiales en el suelo. Las especies de este género presentan el mismo patrón básico de crecimiento apical, tanto en la raíz como en el tallo y la frecuencia de ramificación del brote apical varía con la especie, el cultivar y las condiciones de crecimiento (Brewster, 1994).

3.1.3. Zonas productoras

En Venezuela la producción del ajo se concentra principalmente en el estado Mérida representando para el año 2008 un 58,2% (962,3 ha) de la superficie nacional destinada a este rubro, y de esta superficie, en el municipio Rangel se encuentran 711 ha, ubicándose como el tercer rubro en importancia económica en el estado, después de la papa y la zanahoria. Seguido por Lara, Táchira y Trujillo con 16,09% (266,0 ha), 12,93% (213,85ha) y 12,66% (209,30 ha) de producción y superficie respectivamente (Román y Núñez, 2008).

3.1.4. Importancia económica

En los andes venezolanos, el ajo ha tomado gran importancia económica en los últimos 10 años, especialmente en zonas de cultivo por encima de los 1.000 msnm. En estos niveles altitudinales, donde las condiciones tropicales todavía predominan, son condiciones agroecológicas ideales para expresar al máximo, el potencial de rendimiento y calidad de bulbos de ajo al momento de la cosecha. Tan favorables son estas condiciones, que durante el período 1980-2005, el municipio Rangel del estado Mérida, localizado en el páramo andino, se ubicó como el primer productor de este cultivo del país. Dicho municipio acumuló

el 38,97% de la producción nacional, sembrándose para el 2007, más de 711 ha, lo que representó el 43,03% de la siembra nacional (Román y Núñez, 2008).

Según Fedea (2011) la producción nacional de ajo ha venido aumentando lentamente desde el año 2004, con una producción de 12,104 ton para el año 2007. Esto puede atribuirse a un mejor manejo por parte de los productores debido a su rentabilidad. De igual forma día a día los costos de producción se hacen más elevados, debido fundamentalmente a la gran cantidad de agroquímicos e insumos utilizados para combatir las plagas y enfermedades que atacan el rubro.

3.1.5. Variedades y su comportamiento en campo

Aún cuando el ajo es considerado un cultivo rentable, en el país su producción ha disminuido notablemente siendo la carencia de semillas certificadas para la siembra una de las principales causas (Pardo y Marín, 2003). Su forma de propagación asexual, ha dificultado la producción de semillas certificadas, por lo que los productores hacen uso de los dientes o bulbos de procedencia desconocida como única forma de propagación comercial del cultivo (Pardo *et al.*, 2009).

En Venezuela se siembra una gran cantidad de materiales no identificados, donde predominan los tipos blanco y morado. Muchos productores siembran materiales provenientes de México y Europa, también se mencionan algunas introducciones de países como Perú, Chile, Argentina, Brasil, entre otros (Albarracín *et al.*, 1994). Generalmente los materiales cultivados son agrupados por los mismos productores como ajo “tipo criollo” y ajo “tipo mexicano” (Molina, 2003).

Pardo y Marín (2003), caracterizaron 12 cultivares de ajo colectado en diferentes zonas del municipio Jiménez del estado Lara durante el período 97-98 de acuerdo a las características morfológicas del follaje y características del bulbo, en donde el cultivar AN-1 (color morado) presentó el mayor promedio para longitud y ancho

de hoja, seguido de los cultivares BO-4 (color morado), PAL-1 (color blanco) y AN-2 (color morado). Respecto a las características del bulbo, el PAL-1 destacó sobre el resto de los cultivares con promedios superiores para diámetro, peso y rendimiento del bulbo, por lo que recomiendan el uso de este cultivar para futuros programas de mejoramiento genético del cultivo.

Molina (2003), evaluó la resistencia *in vivo* e *in vitro* de 27 clones de ajo pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto de Agronomía FAGRO - UCV, hacia *Sclerotium cepivorum* Berk, encontrando clones extremadamente susceptibles como V19 y G10 y clones moderadamente resistentes como V06, V13, V14, V20, V24 y V25. Este banco de germoplasma también fue caracterizado morfológicamente e isoenzimáticamente, evidenciándose, pese a que el ajo es una planta de propagación netamente vegetativa, una alta variabilidad entre clones, además ambas caracterizaciones permitieron determinar que todas las muestras evaluadas eran genéticamente diferentes.

Pardo *et al.* (2009), caracterizaron siete clones de ajo procedentes de zonas productoras de los estados Lara y Trujillo, mediante marcadores morfológicos y moleculares (RAPD). Se empleó un análisis de agrupamiento UPGMA con su respectivo dendrograma, así como también el análisis de coordenadas principales. El análisis molecular los diferenció en tres grupos. En el grupo I se ubicaron los clones colectados en las localidades 'Agua Negra' (AN-1, AN-2) y 'El Páramo' (PAL-1, PAL-2); el grupo II se conformó por los clones colectados en 'Bojón' (BO-1) y 'Cubiro' (CUB-1), mientras que en el grupo III se ubicó el clon UCLA-1 colectado en Carache, estado Trujillo. Los resultados sugieren que los clones AN-1 y AN-2, con idéntico perfil electroforético, constituyen un mismo genotipo; sin embargo, han sido distribuidos y sembrados por los productores como materiales distintos. Los clones PAL-1, PAL-2, CUB-1 y BO-1 muestran un valor de 83 % de similitud entre ellos, pero se diferencian en su comportamiento agronómico probablemente debido a la influencia de factores ambientales.

3.1.6. Mejoramiento genético

Durante muchos años nadie creyó en la posibilidad de mejorar genéticamente al ajo, bajo el argumento de que por ser una especie estrictamente agámica no tenía fuentes de variabilidad. La carencia de reproducción sexual en esta especie y, en consecuencia, la falta de recombinación meiótica limitan la variabilidad natural sólo a la acumulación de mutaciones somáticas, sin que puedan descartarse otras fuentes secundarias de variabilidad de menor frecuencia, como pueden ser las recombinaciones mitóticas o la presencia de transposones (Burba, 2009).

Si bien en la actualidad algunos ecotipos de ajo son capaces de florecer y producir semilla botánica, aún al presente no existe en el mercado un cultivar comercial obtenido por hibridación, por lo que la técnica tradicional de selección clonal sigue siendo la herramienta más válida para aprovechar la abundante variabilidad genética que tiene la misma (Burba, 2009).

A pesar de su tipo de propagación, esta hortaliza presenta una interesante variabilidad en los materiales cultivados en el mundo, diferenciándose en madurez, requerimientos de frío, tamaño y color del bulbo, número de bulbillos, facilidad de emitir vara floral, características de la flor y adaptación a las longitudes diferentes del día entre otras (Messiaen *et al.*, 1994).

Por lo dicho anteriormente, se hace necesario evaluar y/o caracterizar los genotipos comúnmente utilizados por los productores para la siembra, de modo de determinar la variabilidad y base genética de los mismos con el fin de conformar un banco de germoplasma y dar inicio a programas de mejoramiento genético que conlleven a la producción de semillas certificadas para uso comercial (Pardo *et al.*, 2009).

3.1.7. Plagas y enfermedades

La semilla de ajo, representada por el mismo bulbo, constituye un reservorio de diferentes especies de microorganismos que actúan en forma saprófita y/o parásita, causando daños en las diferentes fases de desarrollo del cultivo, en postcosecha y a nuevas siembras; situación que ha afectado la producción del país por reducción de la superficie sembrada y caída de los rendimientos al introducir semilla de baja calidad fitosanitaria, que trae consigo contaminación de los suelos potencialmente productivos.

Con el fin de conocer a mayor profundidad la situación planteada, Martínez y Granada (1993), recolectaron bulbos de ajo, destinados para "semilla" en los estados Lara, Mérida y Táchira. En el análisis fitopatológico se detectaron 17 géneros de hongos, algunos habitando sólo en la parte superficial del bulbo y otros internamente, estableciendo una relación más estrecha con el mismo. De estos géneros identificados, algunos son agentes causantes de enfermedades en el cultivo de ajo en el campo, como: *Stemphylium* sp., *Fusarium* sp., *Pyrenochaeta terrestris*, *Alternaria porri*, *Sclerotium cepivorum* y otros a nivel de almacenamiento como: *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. y *Cladosporium* sp. En ambos casos es afectado en forma directa o indirecta el producto comercial, disminuyendo su calidad, tanto para consumo como para semilla.

En relación con los nematodos, de los géneros encontrados en asociación con los bulbos, sólo la especie *Ditylenchus dipsaci* actúa como patógeno sobre el cultivo, afectando directamente al bulbo en condiciones de campo y almacenamiento, disminuyendo su calidad comercial para consumo y "semilla".

Jiménez *et al.* (2009), determinaron la presencia de hongos en la rizósfera de plantas de ajo en dos localidades de la población de Agua Negra, estado Lara. Entre los géneros saprófitos o eventualmente parásitos se encontraron *Aspergillus terreus*, *A. niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium*, *Penicillium* sp, *F. equiseti*, *F.*

oxysporum, *F. solani* y *Pythium* sp. Entre los nematodos destacaron los que dañan el producto comercial, como *Aphelenchus*, *Aphelenchoides* y *Dytilenchus dipsaci*.

Dentro de las principales enfermedades en Venezuela que afectan este cultivo se señalan la podredumbre blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* y la hinchazón de los bulbos provocada por el nematodo *Dytilenchus dipsaci*, ambos presentes de forma persistente en gran parte de las unidades de producción, causando los mayores niveles de pérdida de cosechas, en ausencia de un adecuado control de plagas y enfermedades (Román y Núñez, 2008).

Apoyando lo antes descrito, Cedeño *et al.* (2003), reportan que en el estado Mérida, las enfermedades que han ocasionado las pérdidas más significativas en el cultivo son la "podredumbre blanca" causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk. (60-70% de pérdidas) y la "cachera" inducida por el nematodo *Dytilenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev. A causa del alto nivel de contaminación por *S. cepivorum*, algunas áreas con excelentes condiciones de clima y suelo para la explotación del ajo están siendo ocupadas con otros cultivos.

Según lo descrito por Román y Núñez (2008), las principales enfermedades virales en ajo encontradas en el estado Mérida, son causadas por especies pertenecientes a dos de sus familias formalmente reconocidas: *Potyviridae* y *Flexiviridae*. Entre los miembros de la familia *Potyviridae* se encuentran los virus enanismo amarillo de la cebolla (*Potyvirus Onion yellow dwarf virus*: OYDV), reportado como causante de achaparramientos y reducción de tamaño del bulbo, y el virus rayado amarillo del puerro (*Leek yellow stripe virus*: LYSV) causante de mosaico en hojas.

La familia *Flexiviridae* comprende dos géneros: *Carlavirus* y *Allexivirus*. El primero está representado por el virus latente común de ajo (GCLV), que no produce síntomas aparentes; sin embargo, en combinación con otras especies causa

serias pérdidas de cosechas. El segundo, incluye el *virus X de chalote* (ShVX) y las líneas de virus de ajo (A, B, C, D, E y X), causantes de mosaicos leves en hojas. Los autores concluyeron que todo el ajo cultivado porta una o más de estas especies, formando complejos que de no causar síntomas graves pueden ejercer efectos nocivos sobre el comportamiento fenotípico de este cultivo, como bajos rendimientos, calibres reducidos del bulbo y bajo contenido de materia seca.

3.2. Investigación del cultivo en Venezuela:

Considerando la diversidad de usos como condimento natural o procesado, alta demanda en nuestra dieta diaria y alto valor económico el ajo (*Allium sativum* L.), ocupa el tercer lugar de importancia dentro del grupo de las hortalizas comercialmente cultivadas en el estado Mérida después de la papa y zanahoria.

Esto ha conllevado a la realización de diversos trabajos de investigación asociados con la caracterización morfológica y molecular de clones de ajo (Albarracín, 1994; Molina, 2003; Pardo y Marin, 2003; 2009), métodos de propagación, producción y almacenamiento de semilla (Carrillo, 1985; Ramos, 1988); aspectos agronómicos y generales del cultivo, producción y adaptabilidad (Ramos, 1991; La Cruz *et al.*, 1983; Carrillo, 1985; Núñez y Román 2008); Plagas, enfermedades y control biológico (Acevedo, 1989; Martínez y Granada, 1993; Román y Núñez, 2008; Jiménez *et al.*, 2009; Ulacio, 2011).

En Venezuela, los reportes sobre cultivo de tejidos de ajo y producción de semilla de calidad mediante el uso de la biotecnología es más bien escasa, limitándose a la obtención de metodologías con tasas de multiplicación bajas y medios de cultivos costosos y poco eficientes. Sin embargo, en la facultad de agronomía, UCV, se ha venido realizando una serie de investigaciones sobre el cultivo de tejidos en ajo (González, 1984; Sánchez, 1990; Sánchez, 1995). Igual que en la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (Mujica y Mogollón, 2004; Mujica y Sanabria, 2008). Cabe destacar que no se encontraron reportes en donde se utilizaran medios de cultivo libre de reguladores de crecimiento para la micropropagación de ajo (*Allium sativum* L.).

3.3. Cultivo *in vitro*

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en la regeneración y multiplicación comercial de plantas es el desarrollo más reciente que se ha convertido en una alternativa importante de los métodos convencionales de propagación y producción de semillas en una amplia gama de especies de plantas principalmente aquellas de reproducción asexual o vegetativa como el ajo. La biotecnología, por medio de la técnica de cultivos *in vitro* genera alternativas viables para obtener plantas libres de enfermedades, con niveles altos de productividad (Quispe y Hugo, 2009).

La fortaleza de esta metodología se basa en el aprovechamiento de la totipotencia, es decir la capacidad intrínseca de cada célula vegetal para regenerar un individuo completo con similares características a la planta donadora, la cual fue planteada por Haberlandt en 1902 (Izquierdo y Quiones, 2001).

El cultivo *in vitro* se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, células, tejidos y protoplastos. Estas técnicas se caracterizan por ocurrir sobre una superficie relativamente pequeña, en donde se optimizan las condiciones nutricionales, hormonales, ambientales y de asepsia. En el cultivo *in vitro* un tejido aislado puede dar origen a un callo (organogénesis indirecta) o puede desarrollarse en otras formas, tales como órganos o embriones somáticos (organogénesis directa) (Finol, 2006).

El crecimiento y desarrollo de partes de plantas aisladas pueden ser controladas manipulando la composición de nutrientes y condiciones ambientales durante el cultivo *in vitro*. Los procedimientos *in vitro* pueden ser dirigidos hacia la producción de plantas idénticas (progenie clonal) o para producir variabilidad genética (Quispe y Hugo 2009).

3.3.1. Organogénesis Directa

Las técnicas de propagación *in vitro* son comercialmente factibles para muchas plantas. Sin embargo, la mayoría de ellas detienen su crecimiento como resultado

de la extrema desecación, que ocurre cuando las plantas se transfieren de las condiciones *in vitro* a *ex vitro* en el invernadero y luego en el campo. El ajo tiene la ventaja de propagarse vegetativamente, por lo que los bulbos producidos no deben tener este problema.

Mohamed *et al.* (1995), describieron un procedimiento para la obtención de bulbos de ajo, implantando discos basales de 4 mm de espesor a un medio Murashige y Skoog 1962 (MS), suplementado con benciladenina (BA), el brote obtenido luego de cinco semanas, subcultivado en un medio de inducción de bulbos compuesto de medio MS suplementado con 5 g l⁻¹ de carbón activado y 120 g l⁻¹ de sacarosa con un fotoperíodo de 18 horas y 28 °C. Finalmente los bulbos fueron transferidos directamente al campo y produjeron plantas viables.

Mohamed *et al.* (1994), determinaron un procedimiento para la inducción, regeneración y bulbificación *in vitro* de ápices meristemáticos en ajo y chalote. En un medio MS, suplementado con tiazurón (TDZ), subcultivado en un medio MS suplementado con 5 g l⁻¹ de carbón activado y 120 g l⁻¹ de sacarosa para la inducción de bulbos. Este método podría ser útil para producir bulbos a bajos costos, facilidad de manejo y conservación de semilla.

Shahidul *et al.* (1997), estudiaron la influencia de los reguladores de crecimiento, medios de cultivo y edad del explante de las puntas de raíz en la iniciación y proliferación de brotes. Los mejores resultados los obtuvieron en un medio MS, suplementado con ANA y BA 1 y 10 µM respectivamente, obteniendo un 75% de proliferación de explantes. Resultados similares se obtuvieron con el medio Gamborg (B5), aunque fue mayor el número de brotes por explante, estos eran de menor tamaño. Los autores señalaron que a menor edad del explante, mayor regeneración potencial de brotes. Esta metodología se realizó mediante organogénesis directa evitando la fase de callo reduciendo el riesgo de variación somaclonal, lo cual favoreció la uniformidad genética de los materiales.

Ayabe y Sumi (1998), establecieron una nueva metodología, para la obtención de plantas y bulbos de ajo y demostraron que la parte baja del follaje inmaduro de las hojas llamado “discos basales”, representaba un explante promisorio para la micropropagación masiva de ajo. Veinte a treinta brotes fueron diferenciados por disco basal en un medio Linsmaier y Skoog, 1965 (LS) libre de reguladores de crecimiento en 30 días y más del 90% de los brotes formó bulbos en 30 días de cultivo adicional. Los autores señalaron que el uso de discos basales como explante es el único método donde la diferenciación de brotes es más eficiente en un período de cultivo menor que los protocolos reportados anteriormente (Havránek y Novák 1973; Kehr y Schaeffer 1976; Abo El-Nil 1977; Nagakubo *et al.*, 1993); siendo ésta una herramienta útil para la producción de semilla de ajo libre de enfermedades.

En la búsqueda de una metodología que simplificara de manera eficiente el manejo y la multiplicación de clones para la preservación de la variabilidad genética de un banco de germoplasma *in vitro* de ajo, Baradiah *et al.*, (1999) propuso el uso de bulbos inmaduros como fuente de brotes axilares, sembrados en un medio de cultivo B5, con 0.5 mg l⁻¹ de 2-isopentilamina (2iP) y 0.1 mg l⁻¹ ANA, para las fases de desarrollo desde la iniciación, multiplicación y formación de bulbos. Los autores lograron una multiplicación de brotes que varió de 1:4 a 1:16 brotes por explante en donde los 23 clones evaluados presentaron una tasa de formación de bulbos de 90% con un tamaño de 1-3cm de diámetro luego de seis meses en invernadero.

Posteriormente, Ayabe y Sumi (2001), desarrollaron una nueva técnica de cultivo de tejidos eficiente para la limpieza y la eliminación de virus en plantas de ajo infectadas con LYSV y OYDV. Los autores emplearon como explante el domo basal del tallo con 1mm de espesor, en el medio anteriormente descrito libre de reguladores de crecimiento. Los autores alcanzaron una tasa de regeneración de brotes de 1:25 brotes por explante de 5cm de largo y enraizadas luego de ocho semanas. Las plantas resultantes no mostraron ningún síntoma viral en sus hojas,

incluso cuando se usaron dientes de plantas de ajo con el mosaico severo y los síntomas del enanismo amarillo, siendo esta metodología promisoría para producción de semilla de ajo de calidad garantizándose con el uso de este explante la ausencia de virus y una mayor tasa de multiplicación de brotes por explante.

3.3.2. Organogénesis Indirecta

La organogénesis indirecta se refiere a la iniciación de tallos y raíces adventicias dentro de masa de células de callo. Estas masas de células de callo muy vacuoladas y en gran parte parenquimatosas pueden desarrollar meristemoides, que en condiciones específicas de cultivo, inician órganos. El proceso es similar al de la iniciación de brotes adventicios en explantes, excepto que ha ocurrido un período intermedio de crecimiento independiente de callo (Hutson y Dale, 1994).

Myers y Simón, (1998), señalaron un sistema de producción continua de callos provenientes de las puntas de raíz de los clones DDR7099, PI383819 y Piacenza, los cuales fueron iniciados en un medio B5, suplementado con 4,5 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) durante ocho semanas, subcultivado en el mismo medio con 4.7 μM de picloram + 0.49 μM 2iP por 8 semanas adicionales. El callo embriogénico friable fue transferido al mismo medio de subcultivo pero líquido, para finalmente ser cultivado en un medio semi-sólido de regeneración, con un porcentaje de obtención de brotes de 85,3%. Los autores concluyeron que la proporción de regeneración de brotes disminuyó, cuando el tiempo de desarrollo del callo era mayor de 4 meses.

Haque *et al.*, 1997, 1998; Barandiaran *et al.*, 1999; Robledo *et al.*, 2000, concuerdan en que las raíces son normalmente usadas como explante para el desarrollo de sistemas de regeneración masiva de ajo con o sin una fase del callo, sin embargo el problema con este tipo de explante es la disponibilidad limitada de las puntas apicales de la raíz.

Myers y Simón (1998) reportaron un proceso de producción continua de callo y sistema de regeneración de plantas de ajo usando segmentos de puntas de la raíz. No obstante, el procedimiento desde la inducción del callo hasta la producción de la planta demoró más de 10 meses: seis semanas para la obtención de las plantas *in vitro* con raíces, ocho semanas para la inducción del callo de las puntas de la raíz, 8 semanas adicionales para la proliferación del callo, 1 mes para la suspensión, y 14 semanas para la regeneración.

Zheng *et al.* (2003), lograron un sistema eficiente y rápido de inducción de callo y regeneración de plantas de ajo a partir de segmentos apicales y no apicales de raíz en cuatro meses (dos meses para la inducción de los callos y dos meses para su regeneración). Un componente importante del sistema señalado por dichos autores es la baja concentración de citocininas (0.1 mg l^{-1} 2ip) en el medio de cultivo MS. La regeneración de la planta fue alta en los cuatro cultivares Europeos usados, de 30.1 a 47.6 %. La ventaja del uso de los segmentos de raíz como explante para la producción de callo, es que se pueden cosechar raíces de forma constante cada cuatro o seis semanas de las plantas desarrolladas.

3.3.3. Concentración de sacarosa sobre el crecimiento *in vitro* de bulbos:

Nagakubo *et al.*, 1993; Mohamed *et al.*, 1994, concuerdan que cuando se emplearon medios suplementados con 12% de sacarosa se observó una tasa de inducción de bulbos del 74% en los brotes estudiados. Cuando se utilizaron medios suplementados con 8% de sacarosa, se obtuvo que el 86-90% de los brotes formaron bulbos, que aquellos medios suplementados con 3% de sacarosa luego de 12 semanas de subcultivo (Zel *et al.*, 1997). Cuando se compararon estos resultados con los de Nagakubo *et al.*, (1993) y Seabrook (1994), se encontró que dichos valores eran más altos, en donde solo el 74% y 50% de los brotes formaron bulbos

Kim *et al.* (2003), también afirmaron que con el uso de medios suplementados con 11% de sacarosa se desarrollaron 30 bulbos por explante y el peso fresco de los

brotos fue mayor. Esto mostró que una concentración alta de sacarosa adicionada al medio MS líquido contribuyó al incremento de la producción de bulbos.

3.3.4. Reguladores de crecimiento en la inducción y desarrollo de bulbos en condiciones *in vitro*

Los procesos morfogenéticos en los cuales se logra la propagación *in vitro* son variables y dependen principalmente de la relación auxina/ citocinina (Him y Páez , 1998). No obstante el éxito en la bulbificación, depende altamente de la concentración de reguladores de crecimiento, y de sacarosa entre otros (Mohamed *et al.*, 1995), lo que implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos (Zel *et al.*, 1997).

En un intento por mejorar la eficiencia de bulbificación del ajo tipo morado, Mujica y Mogollón (2004) evaluaron el efecto de la benciladenina (BA), zeatina (Z) y 2-isopentilamina (2-ip), sobre el desarrollo de bulbos, en donde los autores concluyeron que la eficiencia en la microbulbificación fue dependiente del tipo y concentración de citocinina en el medio de cultivo, observándose que la benciladenina (BA), zeatina y 2-isopentilamina (2-ip) estimularon el desarrollo de los microbulbillos en el 100% de los cultivos y sólo el 2-ip presentó una leve tendencia a la bulbificación múltiple. La mayor masa fresca y diámetro ecuatorial se logró con la dosis de 2 mg/L de 2-ip alcanzando promedios de 0,627 g y 10,93 mm respectivamente.

3.3.5. Iluminación en la inducción y desarrollo de bulbos en condiciones *in vitro*

Kim *et al.* (2003), analizaron la inducción y crecimiento de bulbos bajo oscuridad continua y con un fotoperíodo de 16 h luz ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) /8 h de oscuridad. El número de bulbos desarrollado fue mayor en oscuridad. Veintinueve bulbos se

desarrollaron de cada explante cultivado bajo la oscuridad y veinte uno con 16 h luz /8 h oscuridad. El peso total del bulbo aumentó significativamente.

Resultados semejantes se obtuvieron en plantas del genero *Lilium*, en donde la luz suprimió la formación del bulbo (Stimart y Ascher, 1978) y la oscuridad favoreció la formación y crecimiento del bulbo (Nimmi y Onozawa, 1979). Por otra parte existen autores que señalan que la incubación en la oscuridad de los explantes no estimuló la formación de la bulbos (Gerrits y De Klerk, 1992). Este es el caso de Zel *et al.* (1997), quienes demostraron que el crecimiento de los discos basales colocados en la oscuridad resultó ineficaz para la estimulación de los bulbos.

3.3.6. Temperatura en la bulbificación *in vitro*:

Nagakubo *et al.*; 1993; 1997; Takagi, 1990, concuerdan en que dientes de ajo expuestos a una temperatura de 5 °C, por más de 4 meses promueve la formación de bulbos en condiciones *in vitro* de ajo.

Ayabe y Sumi (1998), estudiaron el efecto del pretratamiento a bajas temperaturas de dientes de ajo para el cultivo de discos basales. Los autores demostraron que la formación de los bulbos *in vitro* también aumentó significativamente en más del 95% de los brotes proveniente de dientes pretratados a 4°C por más de 8 semanas, en contraste a los dientes almacenados a temperatura ambiente, los cuales ninguno desarrolló bulbos.

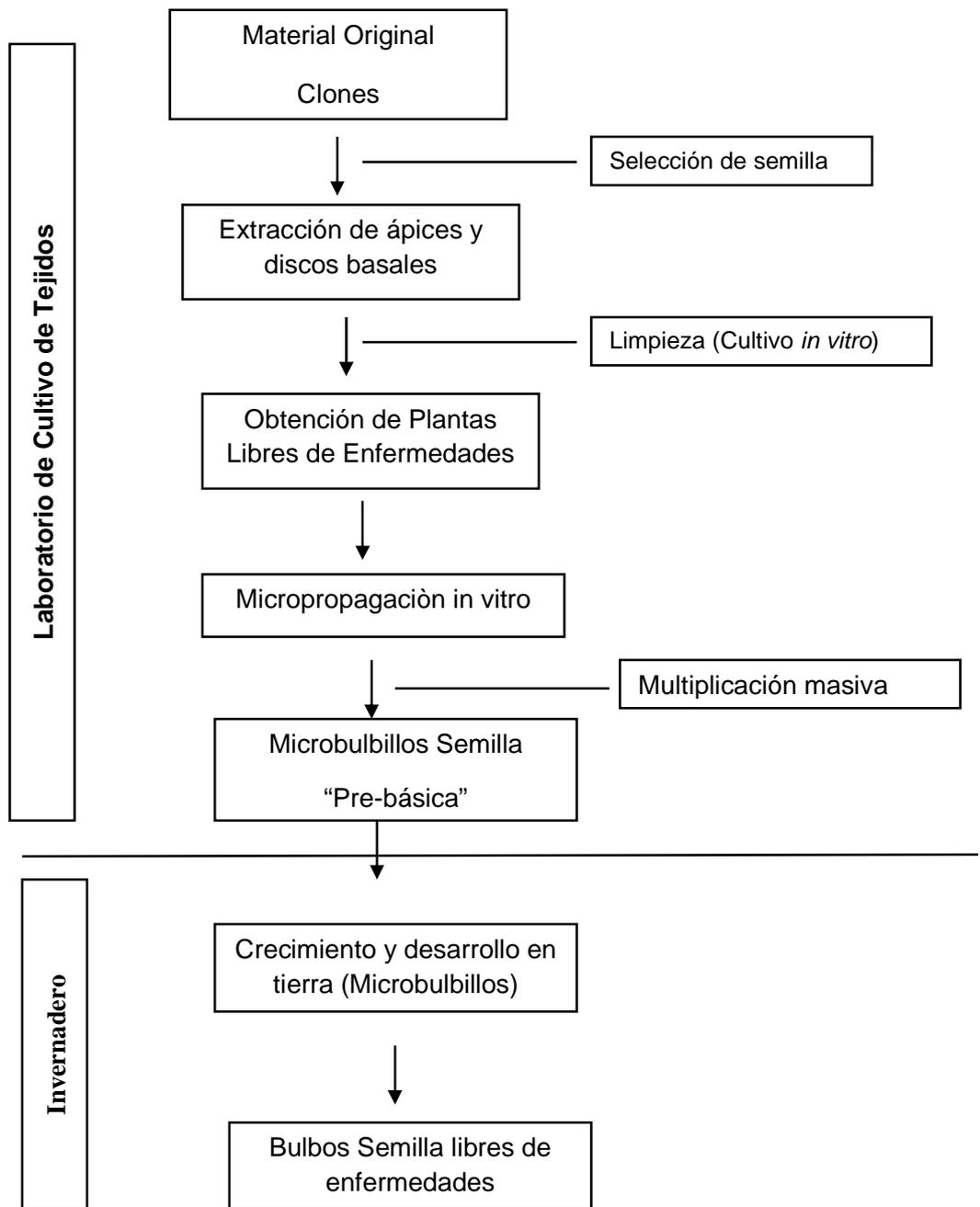


Figura 1. Esquema general para la producción de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de enfermedades.

Modificado de Moriconi, 1997

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del ensayo

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), adscrito al Instituto de Genética de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Núcleo Maracay.

4.2. Material Vegetal

Se utilizaron clones de ajo criollo morado procedente de la zona productora de Apartaderos, estado Mérida (Figura 2). Las semillas se obtuvieron a partir de bulbos de ajo provenientes de la finca "Monte Carmelo", propiedad del Ing. Agr. Alejandro Sequera, cosechados en el mes de noviembre de 2010. En todos los ensayos se utilizó este mismo clon, con el mismo tiempo de cosecha en el campo.

4.3. Preparación del explante

Para esta etapa se siguió la metodología de Ayabe y Sumi (1998) para la extracción de discos basales y para ápices meristemáticos la metodología señalada por Mujica y Mogollón (2004).

Una vez los bulbos de ajo fueron traídos del campo, se cortó todo el follaje, se lavaron con agua jabonosa y se enjuagaron con abundante de agua de chorro.



Figura 2. Apariencia de clones de ajo (*Allium sativum* L.) criollo tipo procedente de la zona productora de Apartaderos, estado Mérida.

4.4. Grelación

Se realizó colocando los bulbos en envases plásticos dentro de una cava, a 8°C por cuatro semanas. Estos dientes gelados fueron usados en los diferentes ensayos para la obtención de los explantes.

4.5. Desinfección

Las cabezas de ajos fueron disgregadas en dientes, los cuales se seleccionaron por tamaño y apariencia sin daños físicos y de color característico, con el fin de garantizar un material uniforme. Los dientes de ajo fueron lavados con una solución jabonosa por 30 min, bajo agitación suave y continua, luego se les eliminaron las hojas envainadoras hasta visualizar el propágulo y posteriormente fueron lavados en una solución de cloro comercial al 70% (Hipoclorito de sodio 3,5% ingrediente activo) por 20 min. Finalmente los propágulos fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril antes de implantación en los medios de cultivo, de acuerdo de la metodología propuesta por (Sánchez, 1995).

4.6. Extracción del explante

Se utilizaron dos tipos de explantes:

1. **Ápices meristemáticos:** Una vez inducido el grelo se seccionaron transversalmente los dientes, se eliminaron hojas envainadoras hasta extraer el ápice meristemático de 0.5 mm.
2. **Discos basales:** Una vez inducido el grelo de cada diente, se realizó un corte transversal en la base del tallo inmaduro (discos basales) de 1mm de espesor aproximadamente (Figura 3).

La extracción de explantes se realizó bajo cámara de flujo laminar, siguiendo el protocolo de desinfección y siembra propuesto por Ayabe y Sumi (1998); para la extracción de discos basales y ápices meristemáticos se utilizó la metodología empleada por Mujica y Mogollón (2004).

El procedimiento se describe a continuación:

- a. Aplicación Micro Plus Acción, el cual es un desinfectante que actúa en frío, bactericida, fungicida y antiséptico compuesto de polimetilendiurea activada al 0,067% por, 5 min.
- b. Tres lavados con agua destilada.
- c. Lavado con cloro comercial al 70 % por 10 min.
- d. Tres lavados con agua destilada.
- e. Extracción del ápice meristemático o disco basal.
- f. Implantación en los medios de cultivo.

La extracción del explante se realizó a los siete días de crecimiento del grelo, utilizando la metodología de Ayabe y Sumi (1998). Estos autores demostraron que entre 5 y 10 días de desarrollo se garantiza que el ápice meristemático y discos

basales estén libres de enfermedades, con una mayor tasa de multiplicación (Figura 4).

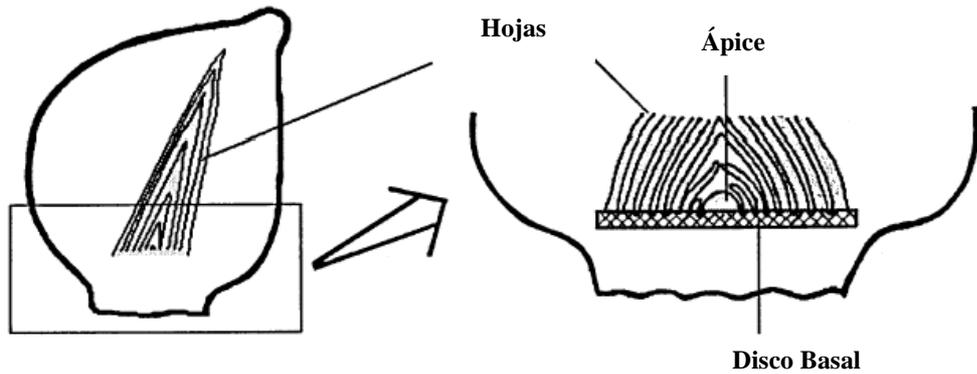


Figura 3. Esquema del diente de ajo donde se representa el llamado disco basal. Tomado de (Ayabe y Sumi, 1998).

Fase del Cultivo	5-7 días	10 días	2 Semanas	3 Semanas
Estado de desarrollo	Domo del ápice  0.5mm	Ápice  1mm	Brotos  1cm	Brotos  >2cm
Detección de virus	—	—	+	+

Figura 4. Tipos de explantes según el tiempo de corte para la eliminación de virus. Modificado de Ayabe y Sumi, 2001.

4.7. Medios de cultivo

Los medios de cultivos empleados estuvieron constituidos por las sales de: MS (1962), LS (1965), B5 (1968).

La composición química de cada medio se describe en el Cuadro 1. La selección de los medios se realizó siguiendo la metodología propuesta por Mohamed *et al.*, (1994-1995); Barandiaran *et al.* (1999); Ayabe y Sumi (1998-2001).

4.8. Condiciones ambientales

El periodo de desarrollo se llevó a cabo bajo cámara de crecimiento, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), a $32 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de luminosidad, fotoperiodo de 16 horas, y temperatura de 18 ± 2 °C.

4.9. Metodología experimental

Con el fin de establecer una metodología óptima para la producción de semilla libre de enfermedades, la presente investigación se dividió en tres etapas:

4.9.1 Determinación del mejor medio de cultivo para el desarrollo de plántulas; así como el tipo de explante ideal que permitiera acelerar y aumentar la tasa de multiplicación de brotes por explante.

Esta etapa constó de dos experimentos, los cuales se diferenciaron por el tipo de explante.

Experimento I: Implantación de ápices meristemáticos en medios semi-sólidos libres de reguladores de crecimiento.

Experimento II: Implantación de discos basales en medios semi-sólidos libres de reguladores de crecimiento.

Como fuente de explantes se usaron dientes de ajo previamente seleccionados y desinfectados en la etapa anterior. El tamaño de dichos explantes fue de 0,5 mm

para ápices meristemáticos y de 1mm de espesor para discos basales. Los explantes se implantaron en los medios de cultivo MS, B5, LS, libre de reguladores de crecimiento (Cuadro 1). El pH se ajustó a 5.7 con la utilización de HCl o NaOH 1N en caso de ser necesario. Como agente gelificante se utilizó Phytigel® (4 g l⁻¹). Se utilizaron frascos con una capacidad de 500ml, a cada uno de los cuales se añadió 30 ml de medio, se taparon y esterizaron a 121°C y 1,05 kg/cm⁻² de presión por 30 min.

Tanto la extracción como la implantación en los medios se realizaron bajo cámara de flujo laminar. Las herramientas de trabajo se esterizaron previamente en autoclave a una temperatura de 121°C y 1,05 kg/cm⁻² de presión por 30 min. Los cultivos se colocaron en un cuarto de crecimiento con condiciones de iluminación (32 μmol m² s⁻¹), fotoperiodo de 16 horas y temperatura de 18±2 °C.

El diseño de experimentos empleado para cada experimento, fue un completamente aleatorizado, con un total de tres tratamientos representados por los medios de cultivo (MS, BS, LS), cuatro repeticiones por tratamiento, un explante por frasco, en donde la unidad experimental estuvo constituida por un frasco. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de explantes que formaron brotes, número de brotes por explante, número de hojas por brote, altura de planta (cm).

4.9.2 Determinación de los niveles óptimos de sacarosa para el desarrollo de microbulbillos que finalmente se pudieran manejar y aclimatizar bajo condiciones de invernadero.

La evaluación se llevó a cabo mediante la realización de un experimento considerando que el medio LS presentó los mejores resultados para la regeneración, multiplicación y desarrollo de plantas de ajo. La selección de tres concentraciones de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹), se realizó tomando como criterio la metodología reportada por Mujica y Mogollón (2004).

Experimento III: Inducción de bulbificación de las plantas regeneradas en la primera etapa.

A los 45 días de la micropropagación las plántulas con una altura que varió entre 7 y 12 cm, fueron separadas y seccionadas a 2 cm a partir de la base, incluyendo remoción de raíces (Figura 5). Estos brotes se transfirieron a frascos de 500 ml que contenían 30 ml del medio LS complementado individualmente con tres concentraciones de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹). Los medios fueron previamente esterilizados en las mismas condiciones descritas para la micropropagación.



Figura 5. Plántula de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 45 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* con el uso de explante de disco basal

La implantación se efectuó bajo cámara de flujo laminar, colocando un brote por frasco. Los brotes se colocaron en posición vertical, introduciendo una pequeña parte del extremo proximal en el medio de cultivo. Las condiciones del cultivo fueron: iluminación (32 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$), fotoperiodo 16 horas y temperatura de 18 \pm 2 °C durante ocho semanas.

El diseño de experimento fue un completamente aleatorizado, con un total de tres tratamientos representados por la concentración de sacarosa (30,60 y 90 g l⁻¹),

cuatro repeticiones por tratamiento, un brote por frasco en donde la unidad experimental estuvo constituida por cuatro frascos. Las variables estudiadas fueron: porcentaje de brotes con bulbos, número de bulbos por brote, diámetro ecuatorial (mm) y masa fresca (g).

Los datos se analizaron mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis) y las medias se separaron con la prueba de comparación de rangos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el uso del programa el programa Statistix 8.2 (Versión 8.0 para Windows).

4.9.3. Aclimatización de los microbulbillos bajo condiciones de invernadero.

Experimento IV: Aclimatización de microbulbillos regenerados en la segunda etapa.

Para llevar a cabo esta etapa se seleccionaron las plántulas que formaron microbulbillos en el experimento III. A los 60 días de la microbulbificación las plántulas con una altura promedio de 7 cm y un diámetro ecuatorial promedio de 9mm con presencia de raíces, fueron colocadas en vasos plásticos contentivos de sustrato Sunshine Mix # 5 cuyo componente básico es la turba rubia del musgo *Sphagnum canadiense* y perlita esterilizada.

A cada planta le fue colocada una bolsa de plástico transparente de manera de hacer una cámara húmeda, permitiendo a las plántulas reducir el efecto ambiental de las instalaciones. Finalmente a los 10 días se retiró la bolsa para determinar la respuesta a bajo condiciones de invernadero. La variable evaluada fue el porcentaje de microbulbillos aclimatizados.

Cuadro 1. Composición química de los medios utilizados para la propagación y bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado.

COMPUESTO	MEDIOS DE CULTIVO (g l ⁻¹)		
	MS	B5	LM
NH ₄ NO ₃	16,5		16,5
KNO ₃	19,0	25,0	19,0
KH ₂ PO ₄	1,7		1,7
CaCl ₂ 2H ₂ O	4,4	1,5	4,4
MgSO ₄ 7H ₂ O	3,7	2,5	3,7
(NH ₄) ₂ SO ₄		1,3	
NaH ₂ PO ₄ .4H ₂ O		1,5	
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	13,20	22,3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	2,00	8,4
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
KI	0,83	0,75	0,83
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	250	250	250
H ₃ BO ₃	6,2	0,003	6,2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,00025	0,025
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,85	27,7
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	37,3	37,3	37,3
Tiamina	0,1	10,00	0,4
Acido nicotínico	0,5	1,00	
Piridixina	0,5	1,00	
Myo- inositol	100,00	100,00	100,00
Sacarosa	30	30	30
Phytigel®	4	4	4
pH	5,7	5,7	5,6

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Medio de cultivo y tipo de explante para el desarrollo de plántulas

Experimento I: Implantación de ápices meristemáticos en medios semi-sólidos libres de reguladores de crecimiento.

Variables cuantitativas:

5.1.1. Porcentaje de explantes que formaron brotes

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre los tratamientos. La formación de brotes ocurrió en los medios MS y LS. La mejor respuesta ocurrió con el medio LS, obteniéndose 37,5% de explantes con brotes en comparación al medio MS donde fue de 7,5% (Cuadro 2; Figura 6).

Cuadro 2. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes a partir de explantes de meristemas apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Formación de brotes por explante (%)
MS	7,5 ^b
LS	37,5 ^a
B5	0 ^b

Medias con letras desiguales en la misma columna, difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

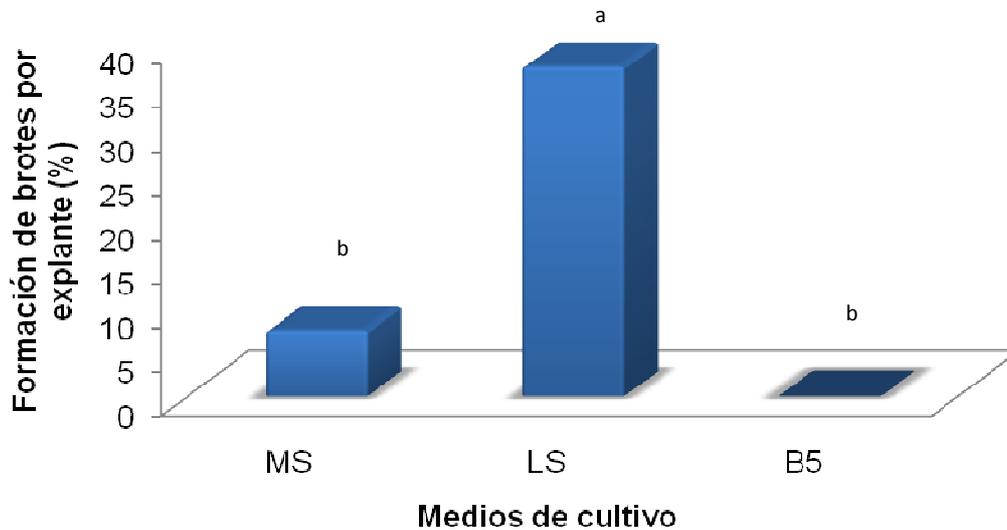


Figura 6. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L.).

Es importante resaltar que en estudios previos llevados a cabo para la micropropagación de ajo (*Allium sativum* L.), no se emplearon medios de cultivo libre de reguladores de crecimiento con el uso de este explante, en toda la bibliografía consultada siempre se utilizaron diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento para la inducción, multiplicación y desarrollo de brotes (Nagakubo *et al.*, 1993; Mohamed *et al.*, 1994; 1995; Sánchez, 1995; Mujica y Mogollón, 2004). Los reguladores del crecimiento han sido señalados por los autores anteriormente nombrados como indispensables para el establecimiento y desarrollo de plántulas de ajo a partir de explantes de meristemos, ápices o yemas en condiciones *in vitro*. Sin embargo, estos resultados nos plantean la posibilidad de obtener plántulas de ajo con el uso de un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, pudiéndose bajar los costos de producción, ya que se sabe que los reguladores de crecimiento son el constituyente más costoso de los medios de cultivo empleados para la producción *in vitro*. También, se puede señalar que en la bibliografía local consultada de ajo no se encontraron trabajos anteriores, en donde se evaluarán las variables descritas en este trabajo a pesar

de su importancia como punto de referencia en la obtención de un protocolo eficiente de micropropagación. Por lo que los resultados obtenidos, representan un aporte interesante para el estudio de la respuesta morfogénica de explantes de meristemas apicales de ajo en medios de cultivos sin el uso de reguladores de crecimiento.

5.1.2. Número de brotes por explante

Debido a que la formación de brotes solo ocurrió en dos tratamientos (MS y LS), las variables número de brotes/explante así como número de hojas por brote y altura de planta se evaluaron únicamente en estos tratamientos.

La prueba de Kruskal-wallis no detectó diferencias significativas para la variable número de brotes/ explante, todos los tratamientos diferenciaron 1 brote por explante (Cuadro 2; Figura 7).

Cuadro 3. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes por explante a partir de explantes de meristemas apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Nº brotes/ explante
MS	1
LS	1
B5	0

Medias con letras desiguales en la misma columna, difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

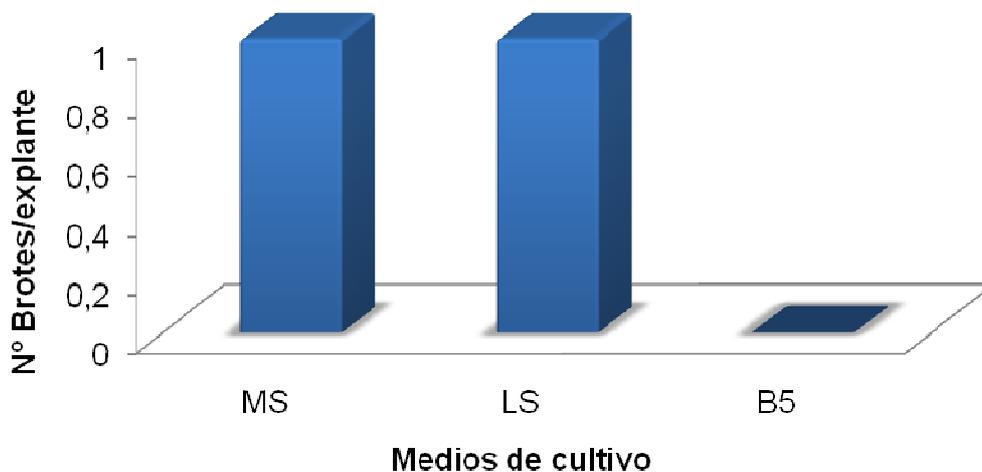


Figura 7. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes por explante a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Estos resultados coinciden parcialmente con los de Quezada *et al.* (1998), quienes lograron un brote por explante con la variedad 'Rosado de Italia', cuando se utilizó un medio MS+B5 suplementado con 2-iP (1-3 mg/L) y ANA (0.1-0.3 mg/L).

Los resultados aquí obtenidos indican que la formación de brotes en ajo (*Allium sativum* L), ocurre sin la suplementación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo.

5.1.3. Número de hojas por brote

La prueba de Kruskal-wallis detectó diferencias significativas entre los tratamientos para la variable número de hojas por brote (Cuadro 4; Figura 8). La mejor respuesta ocurrió con el medio MS, obteniéndose dos hojas por brote. Estos resultados son similares a los de Cardenas (1995), quien reportó un número de hojas diferenciadas por brote de dos, para en tres variedades de ajo 'Cadereyta', 'Celaya' y 'Taiwan' en medio MS.

Cuadro 4. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de hojas/ brote a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Nº hojas / brote
MS	2 ^a
LS	1 ^b
B5	0 ^b

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

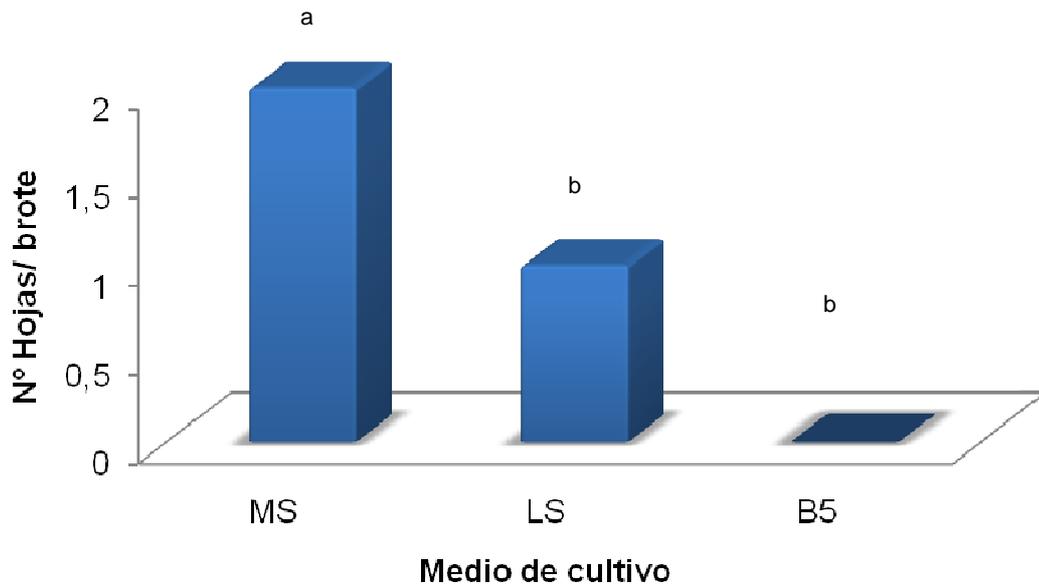


Figura 8. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de hojas/ brote a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L).

5.1.4. Altura de brote

La prueba de Kruskal-wallis no detectó diferencias significativas entre los tratamientos para la variable altura de brote (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la altura de brote (cm) a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Altura de brote (cm)
MS	6.3
LS	6.9
B5	0

Estos resultados sin el uso de reguladores de crecimiento, superaron notoriamente a los de Moroconi *et al.* (1990) y Rodríguez *et al.* (2001), quienes lograron una altura promedio de plantas de 1,68 cm y de 2,54 cm, ambos con el uso de un medio MS suplementado con 0.1 mg l⁻¹ de AIA y 0.1 mg l⁻¹ KIN.

Variables cualitativas:

5.1.5. Iniciación de brotes a partir de explantes de meristemos apicales

La iniciación de brotes solo ocurrió para los medios MS y LS, para los dos casos los brotes se formaron a los 30 días de su implantación (Figura 9 y 10). Estos resultados coinciden parcialmente, con los de Mujica y mogollón (2004), quienes suplementaron los medios de cultivo con reguladores de crecimiento y obtuvieron diferenciación de brotes a los 30 días de su implantación, el mismo tiempo que los resultados obtenidos en esta investigación sin el uso de reguladores de crecimiento. También superaron notoriamente a los resultados de Rodríguez *et al.* (2001), quienes lograron iniciación de brotes a los 60 días de su implantación. Esta variable es de gran importancia a la hora de masificar la producción de semilla de ajo, ya que se espera, que se desarrolle un mayor número de brotes en menor tiempo.

En el medio B5 se observó desarrollo de callo a los 30 días de la implantación (Figura 11). Estos resultados son similares a los reportados por Myers y Simón

(1998), en donde los autores concluyeron que el medio B5 favoreció a la formación de callos a partir de ápices meristemáticos. En el presente estudio dicha metodología no fue empleada, ya que se pretendió ajustar un protocolo de regeneración de plantas y bulbos de ajo *Allium sativum* L *in vitro* mediante organogénesis directa, reduciendo el riesgo de variación somaclonal, favoreciendo la uniformidad genética de los materiales (Shahidul *et al.*, 1997).

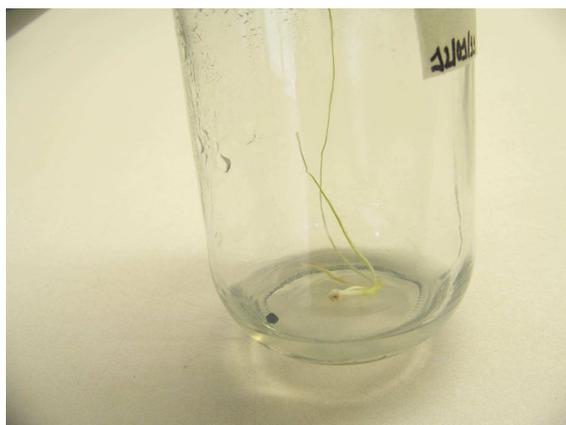


Figura 9. Plántula de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 30 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* con el uso de explante de meristemo apical

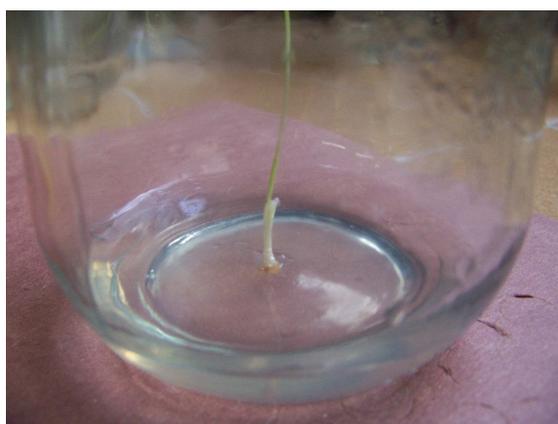


Figura 10. Plántula de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 30 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* con el uso de explante de meristemo apical

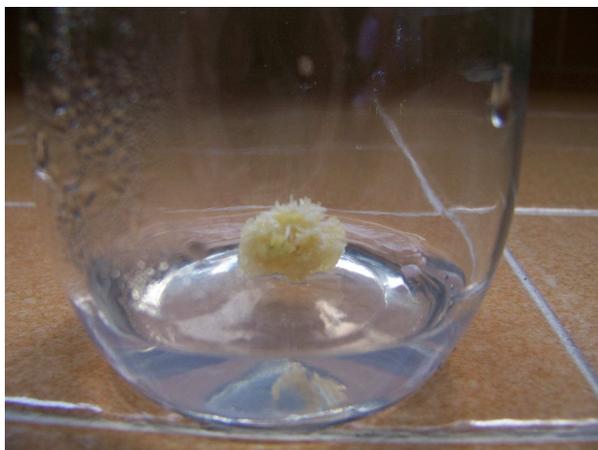


Figura 11. Callo de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 30 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* con el uso de explante de meristemo apical

Experimento II: Implantación de discos basales en medios semi-sólidos libres de reguladores de crecimiento.

Variables cuantitativas:

5.1.6. Porcentaje de explantes que formaron brotes

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La formación de brotes ocurrió solo en los medios MS y LS. El medio LS superó a todos los tratamientos restantes con los valores más altos de porcentaje de regeneración de brotes 42,5% (Cuadro 6; Figura 12), similar a lo ocurrido con los explantes de meristemo apical. En el resto de los tratamientos medios MS y B5, la producción de brotes fue muy poca o no ocurrió 12,5 y 0% respectivamente. Se observaron claras tendencias en el medio LS para la regeneración de brotes, independientemente del tipo de explante utilizado.

Cuadro 6. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes a partir de explantes de discos basales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Formación de brotes por explante (%)
MS	12,5 ^b
LS	42,5 ^a
B5	0 ^b

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

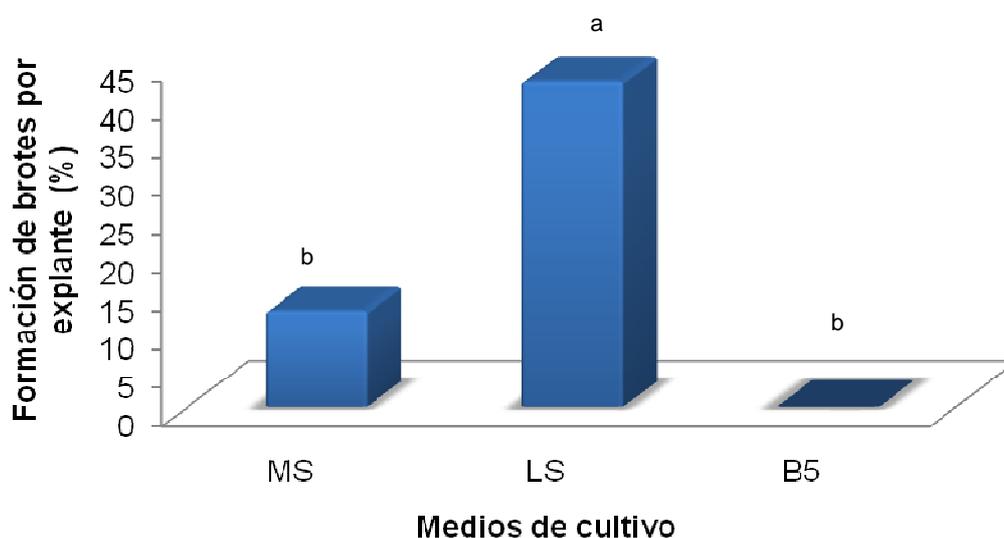


Figura 12. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la formación de brotes a partir de discos basales de ajo (*Allium sativum* L).

Los resultados obtenidos difieren con los señalados por Mohamed et al. (1995), quienes lograron un alto porcentaje de establecimiento y regeneración de brotes (70%), utilizando discos basales de 4mm, en un medio MS, suplementado con 0.4 mg l⁻¹ de BA. Esta diferencia podría atribuirse a dos razones: 1) El Uso de reguladores de crecimiento en el medio, en relación con el medio empleado en este ensayo ausente de reguladores de crecimiento, 2) El tamaño del explante utilizado por los autores (4mm), a diferencia del empleado en este ensayo (1mm). En la medida que el explante sea de menor tamaño, se tiene una mayor probabilidad de estar libre de patógenos, pero menores probabilidades de que se establezcan y prosperen *in vitro*, y viceversa (Rodríguez *et al.*, 2001). También difieren con los de Ayabe y Sumi (1998), quienes lograron mayores porcentajes de regeneración de brotes (75%), utilizando discos basales de 1mm, en un medio LS, libre de reguladores de crecimiento. Esta diferencia podría atribuirse al efecto del genotipo, ya que los autores emplearon un clon de ajo (*Allium sativum* L.) uniforme en cuanto a sus características comerciales, en tanto que el material empleado en este estudio variable fenotípica y genotípicamente.

Por otra parte, es importante señalar que en la bibliografía local consultada de ajo, no se encontraron trabajos previos en donde se evaluarán las variables descritas en esta investigación para el uso de explantes de discos basales. Por lo que los resultados obtenidos, representan un aporte interesante para el estudio de la respuesta morfogénica y comportamiento en condiciones *in vitro* de explantes de discos basales de ajo en medios de cultivos sin el uso de reguladores de crecimiento.

Los resultados aquí obtenidos indican que la formación de brotes en ajo (*Allium sativum* L), ocurre sin la suplementación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo.

5.1.7. Número de brotes por explante

Debido a que la formación de brotes solo ocurrió en dos tratamientos (MS y LS), las variables número de brotes/explante, así como número de hojas por brote y altura de planta se evaluaron únicamente en estos tratamientos.

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias altamente significativas entre los tratamientos. La mejor respuesta ocurrió con el medio LS, obteniéndose tres brotes por explante, en comparación al medio MS donde fue de un brote por explante, similar a lo ocurrido con el explante de meristemo apical (Cuadro 7; Figura 13).

Cuadro 7. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes a partir de explantes de discos basales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Nº brotes/ explante
MS	1 ^b
LS	3 ^a
B5	0 ^b

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

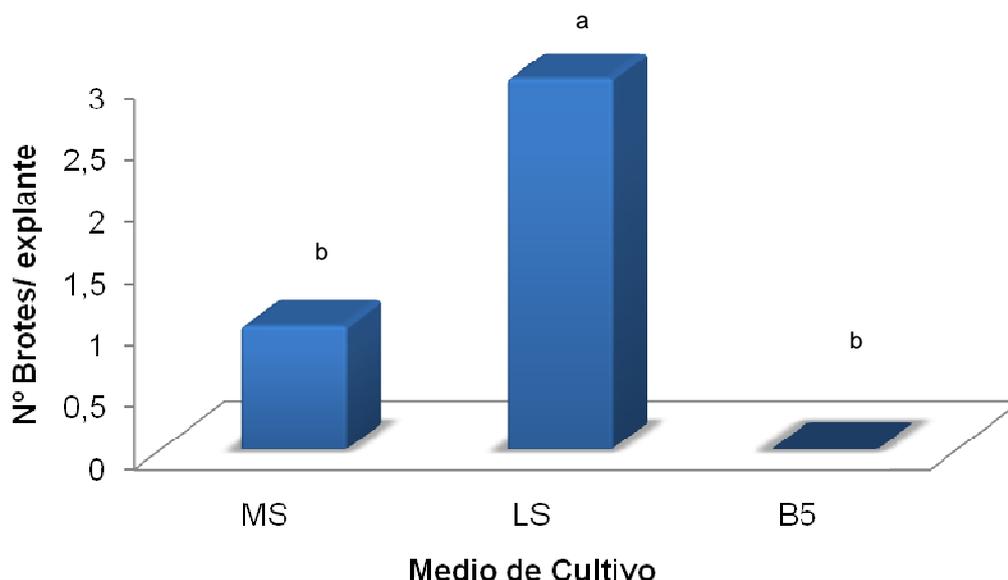


Figura 13. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de brotes por explante a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Estos resultados difieren con los de Ayabe y Sumi (1998), quienes obtuvieron una tasa de multiplicación de 20 a 30 brotes/ explantes a partir de discos basales de 1mm de espesor y medio LS libre de reguladores de crecimiento. Esta diferencia podría atribuirse que los autores emplean una variedad de ajo (*Allium sativum* L. cv 'Fukuchi-howaito') material de ajo perfectamente uniforme en cuanto a sus características comerciales, en tanto que el material que se emplea en nuestro medio es sumamente variable. Estos resultados indican que la "variedad" o el "clon" es determinante en la obtención de mejores resultados.

En la bibliografía local consultada el uso de explantes de disco basal no ha sido reportado en el cultivo *in vitro* ajo. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo parecieran una buena fuente de material de propagación, demostrándose que es posible producir una relación de 1:3 explante/brote, en un medio sin reguladores de crecimiento. Estos son resultados promisorios ya que se logró aumentar la tasa de multiplicación, mediante el uso de

un medio de cultivo económico, que no requiere reguladores de crecimiento, los cuales son el constituyente más costoso de los medios de cultivo empleados para la producción *in vitro*.

5.1.8. Número de hojas por brote

La prueba de Kruskal-wallis no detectó diferencias significativas para la variable número de hojas por brote, todos los tratamientos diferenciaron dos hojas por brote (Cuadro 7; Figura 14). Resultados similares se observaron con el explante de meristemo apical en el medio MS

No se encontraron trabajos previos en donde fuera analizada esta variable, para explantes de discos basales.

Cuadro 8. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de hojas/ brote a partir de explantes de discos basales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Nº hojas / brote
MS	2
LS	2
B5	0

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

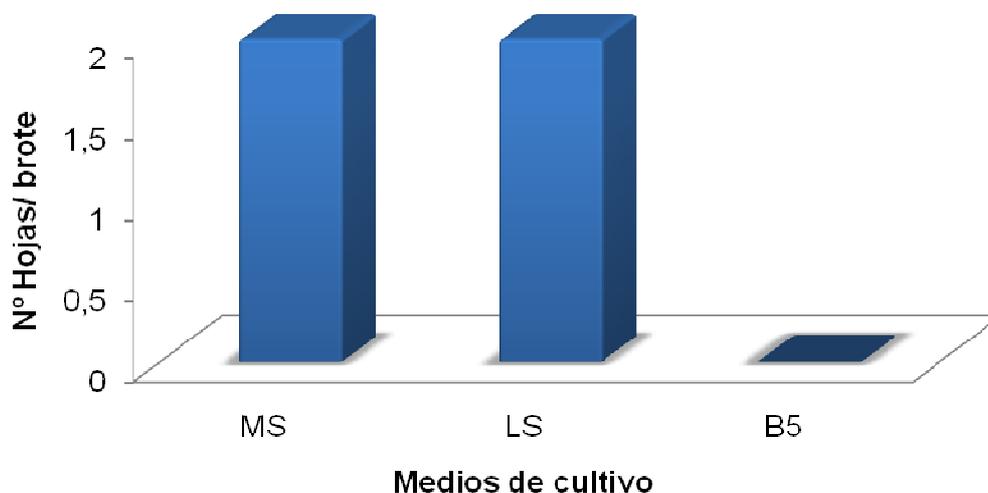


Figura 14. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre el número de hojas/ brote a partir de explantes de discos basales de ajo (*Allium sativum* L).

5.1.9. Altura de brote

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre los tratamientos. La mejor respuesta ocurrió con el medio LS, obteniéndose una altura promedio de 9,4 cm en comparación al medio MS donde fue de 6.5 (Cuadro 8; Figura 15), similar a lo ocurrido con los explantes de meristemo apical. Con relación a esta variable, no se encontraron trabajos previos en donde fuera analizada, para el explante de disco basal.

Estos resultados nos indican que el medio LS, expresó una alta eficiencia para la formación, multiplicación y establecimiento de brotes, independientemente del tipo de explante utilizado.

Cuadro 9. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la altura de planta (cm) a partir de explantes de meristemos apicales de ajo (*Allium sativum* L).

Medios de cultivo	Altura de brote (cm)
MS	6.5 ^b
LS	9.4 ^a
B5	0 ^c

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente por prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

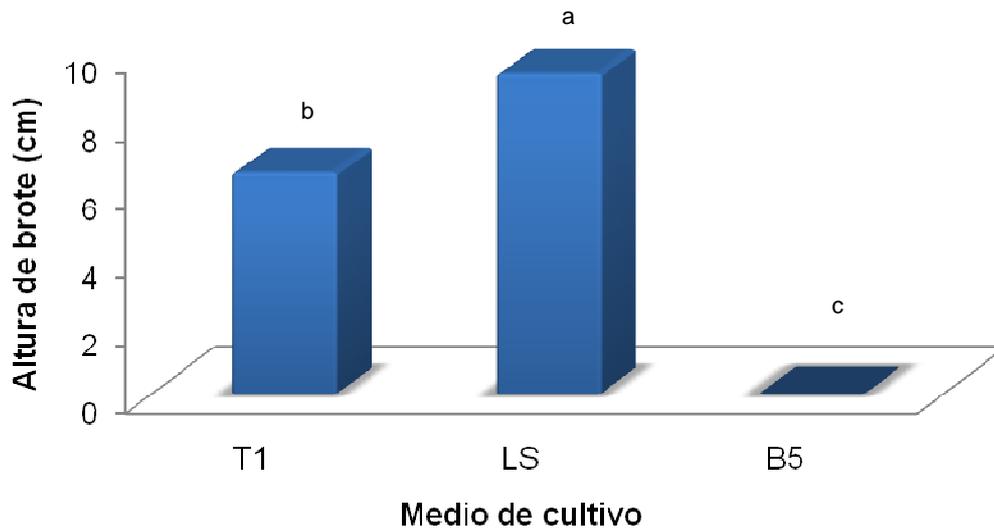


Figura 15. Efecto de los medios MS, LS, B5 libre de reguladores de crecimiento sobre la altura de brotes a partir de explantes de discos basales de ajo (*Allium sativum* L).

Variables cualitativas:

5.1.10. Iniciación de brotes a partir de explantes de discos basales

La iniciación de brotes solo se evidenció en los medios MS y LS. Para el medio LS, los brotes se formaron a los 45 días luego de su implantación, en comparación al medio MS que fue de 60 días. (Figura 16 y 17). Estos resultados difieren con los de Ayabe y Sumi (1998), quienes lograron mayores porcentajes de regeneración de brotes, en menor tiempo 30 días, con el uso del mismo tipo de explante y medio de cultivo utilizado en este ensayo.

También es importante señalar que para el caso del explante de disco de tallos se observó la presencia de raíces en todos los tratamientos donde se desarrollaron brotes, a diferencia de los explantes de meristemo apical en donde no se formaron raíces en ninguno de los medios utilizados.

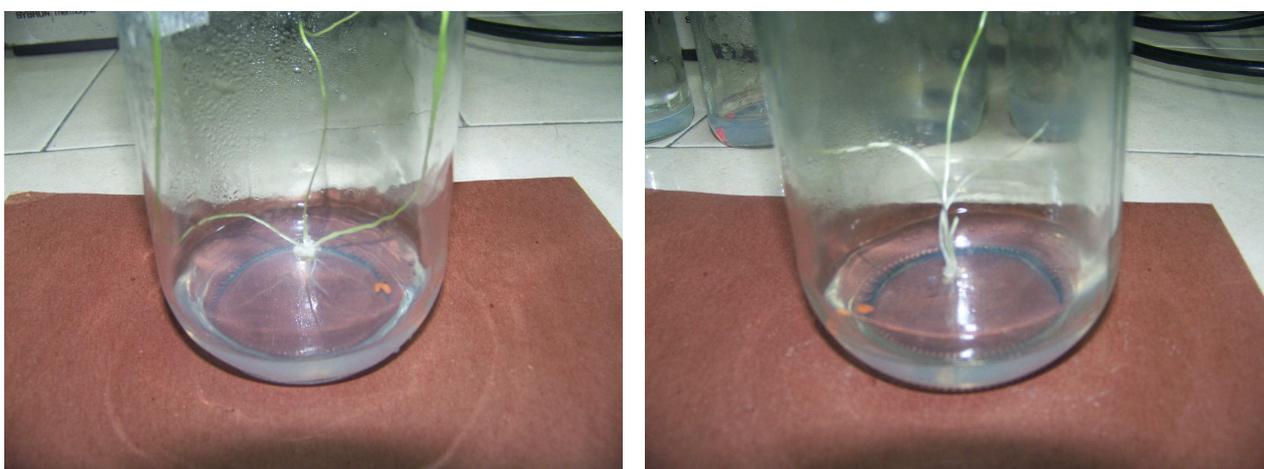


Figura 16. Plántula de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 45 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* con el uso de explante de disco basal



Figura 17. Plántula de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 45 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* con el uso de explante de disco basal.

5.2. Determinación de los niveles óptimos de sacarosa para el desarrollo de microbulbillos

Experimento III: Inducción de bulbificación de las plantas regeneradas en la primera etapa.

Variables cuantitativas:

5.2.1. Porcentaje de bulbificación

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados. Es importante observar que no todos los explantes produjeron bulbos. La mejor respuesta ocurrió en aquellos tratamientos suplementados con la concentración de sacarosa 90 g l^{-1} (Cuadro 10; Figura 18). En el resto de los tratamientos dosis de 60 g l^{-1} y 30 g l^{-1} , la producción de bulbos fue muy poca o no ocurrió (37,5 y 0% respectivamente). Se observó que a medida que se aumentó la concentración de sacarosa en el medio, la inducción y desarrollo de bulbos fue mayor.

Cuadro 10. Efecto de tres dosis de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹) sobre la bulbificación in vitro de ajo (*Allium sativum* L.).

Concentración de sacarosa (g l ⁻¹)	Bulbificación (%)
30	0 ^b
60	37,5 ^b
90	100 ^a

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

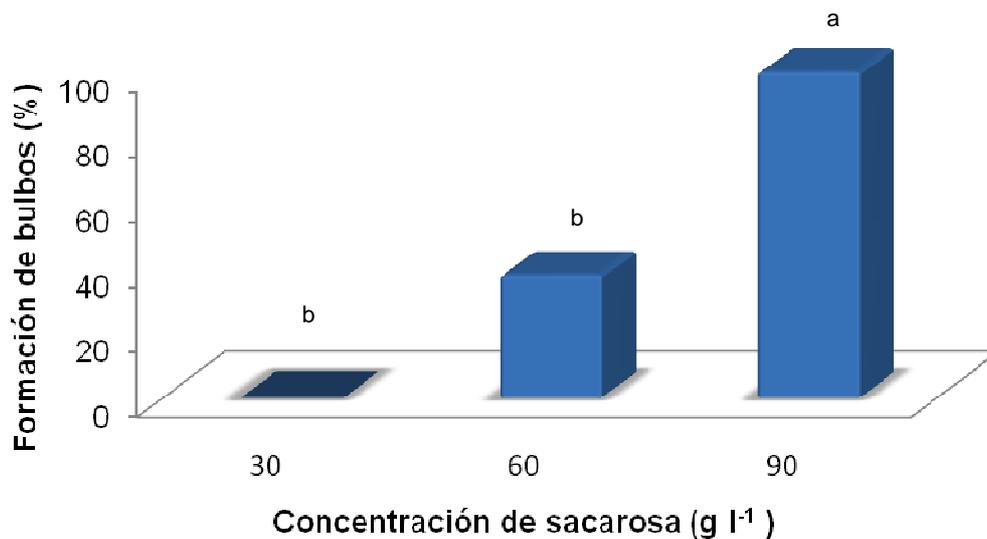


Figura 18. Efecto de tres dosis de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹) sobre la bulbificación in vitro de ajo (*Allium sativum* L.).

Los resultados superaron notoriamente a los de Seabrook (1994), quienes lograron sólo un 59% de bulbificación, utilizando un medio suplementado con 90 mg.l⁻¹ de sacarosa. También con los de Nagakubo *et al.* (1993) y Zel *et al.* (1997), quienes consiguieron valores de bulbificación de 74 y 86 % respectivamente, empleando un medio suplementado con 120 g l⁻¹ de sacarosa. Cabe destacar que en los trabajos previamente descritos, se emplearon medios suplementados con altas concentraciones de sacarosa y reguladores de crecimiento, los autores concluyeron que la sacarosa es uno de los factores de mayor importancia a la hora de la inducción de bulbos de ajo bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados demuestran que es posible la inducción de bulbos a partir de brotes de ajo, empleando medios suplementados sólo con 90 g. l⁻¹ de sacarosa sin el uso de reguladores de crecimiento.

5.2.2. Diámetro ecuatorial de microbulbillos (mm)

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias altamente significativas para la variable diámetro ecuatorial de microbulbillos, observándose claras diferencias entre los tratamientos. El mayor valor para esta variable ocurrió en el medio suplementado Con 90 g l⁻¹ de sacarosa, obteniéndose un diámetro de 9,5 mm, en comparación con el tratamiento de 60 g l⁻¹ donde fue de 1,7mm de diámetro (Cuadro 11; Figura 19). Las tendencias mostraron un mayor diámetro ecuatorial a medida que se aumentó la dosis de sacarosa en el medio.

Estos resultados coinciden parcialmente con los reportados por Quezada *et al.* (1998), quienes lograron microbulbillos con diámetros que oscilaron entre 3-10 mm de diámetro en un medio MS suplementado con reguladores de crecimiento y 50 g l⁻¹ de sacarosa con la variedad 'Colorado de Mendoza'. Por otra, parte superaron notoriamente a los resultados de Mujica y Mogollón (2004), quienes lograron un diámetro ecuatorial de 7,55 mm, en un medio MS suplementado con 90 g.l⁻¹ de sacarosa. Los autores señalaron que la sacarosa en bajas concentraciones, actúa estimulando la división y la elongación celular.

Cuadro 11. Efecto de tres dosis de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹) sobre el diámetro ecuatorial de microbulbillos *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.).

Concentración de sacarosa (g l ⁻¹)	Diámetro ecuatorial de microbulbillos (mm)
30	0 ^b
60	1,7 ^b
90	9,5 ^a

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

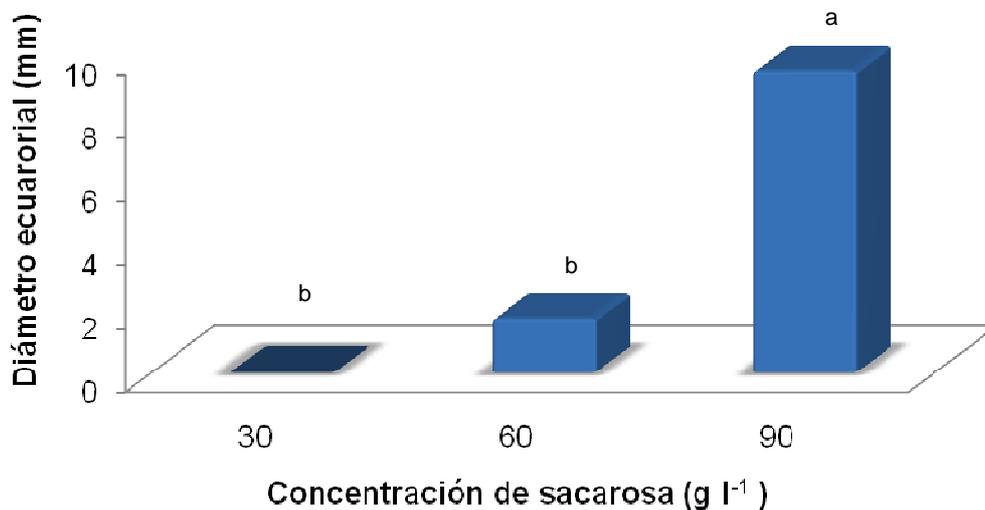


Figura 19. Efecto de tres dosis de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹) sobre el diámetro ecuatorial de microbulbillos *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.).

3.2.3. Masa Fresca de microbulbillos (g)

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados. Con la concentración de $90 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sacarosa se obtuvieron los mayores valores de masa fresca $0,49 \text{ g}$, en comparación con el uso de $60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ donde fue de $0,13 \text{ g}$ (Cuadro 12; Figura 20). Así mismo, tanto la masa fresca como el diámetro ecuatorial aumentaron significativamente al aumentar las dosis de sacarosa.

De la misma forma estos resultados coinciden parcialmente con los de Quezada *et al.* (1998), quienes lograron con la variedad 'Colorado de Mendoza' microbulbillos con pesos que oscilaron entre $0.025\text{-}0.555 \text{ g}$ en un medio MS suplementado con reguladores de crecimiento y $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sacarosa. Superaron los resultados de Mujica y Mogollón (2004), quienes lograron un peso de $0,29 \text{ g}$, en un medio MS suplementado con $90 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de sacarosa y los de Martínez *et al.* (2010), quienes reportaron pesos de $0,35$ para el clon 'Criollo'. Los autores concluyeron que en condiciones *in vitro* el desarrollo del bulbillo dependió principalmente de la concentración de sacarosa adicionada al medio.

Los resultados observados para las variables previamente descritas plantean que la microbulbificación del ajo (*Allium Sativum* L.), fue significativamente afectada por la concentración de sacarosa en el medio, la cual aumentó con el incremento en la concentración de 30 a $90 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Esta respuesta puede deberse al efecto inductor de este carbohidrato a bajas concentraciones, lo que resulta en un potencial menos negativo en el medio, estimulando la división y la elongación celular. Otra posible explicación, es el hecho de que la sacarosa es hidrolizada extra celularmente a glucosa y fructosa, debido a la enzima ácido invertasa asociada con la pared celular, la cual puede ser secretada por el tejido de los microbulbos hacia el medio de cultivo (Mujica y Mogollón, 2004).

Cuadro 12. Efecto de tres dosis de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹) sobre la masa fresca de microbulbillos *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.).

Concentración de sacarosa (g l ⁻¹)	Masa Fresca de microbulbillos (g)
30	0 ^b
60	0,13 ^b
90	0,49 ^a

Medias con letras desiguales en la misma columna difieren significativamente según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$

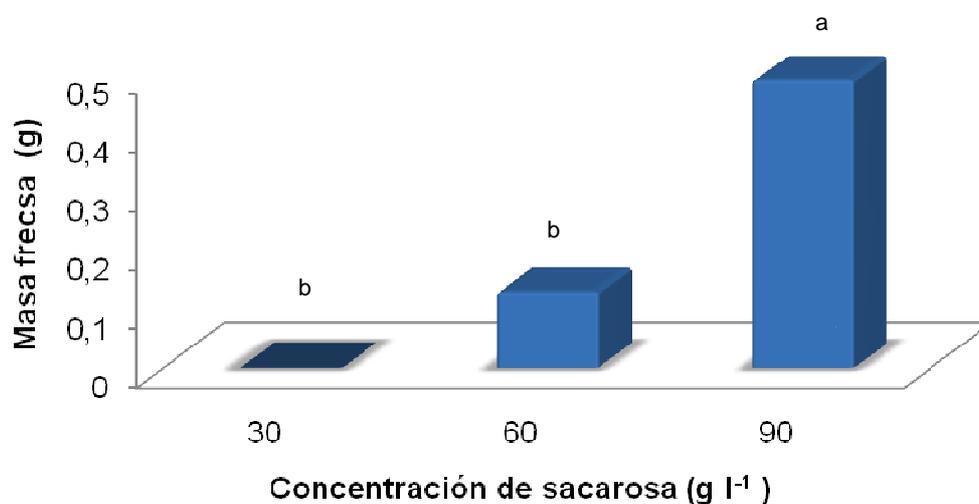


Figura 20. Efecto de tres dosis de sacarosa (30, 60 y 90 g l⁻¹) sobre el diámetro ecuatorial de microbulbillos *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.).

Variables cualitativas:

5.2.4. Iniciación de bulbos

La iniciación de bulbos solo se evidenció en los tratamientos suplementados con 60 y 90 g l⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo. Para ambos tratamientos la inducción de bulbos ocurrió a los 60 días luego de su implantación. (Figura 21, 22 y 23). Estos resultados concuerdan con los de Ayabe y Sumi (1998), Mujica y Mogollón (2004) y Martínez *et al.*, (2010) quienes reportaron tiempo similar para la inducción de los mismos.

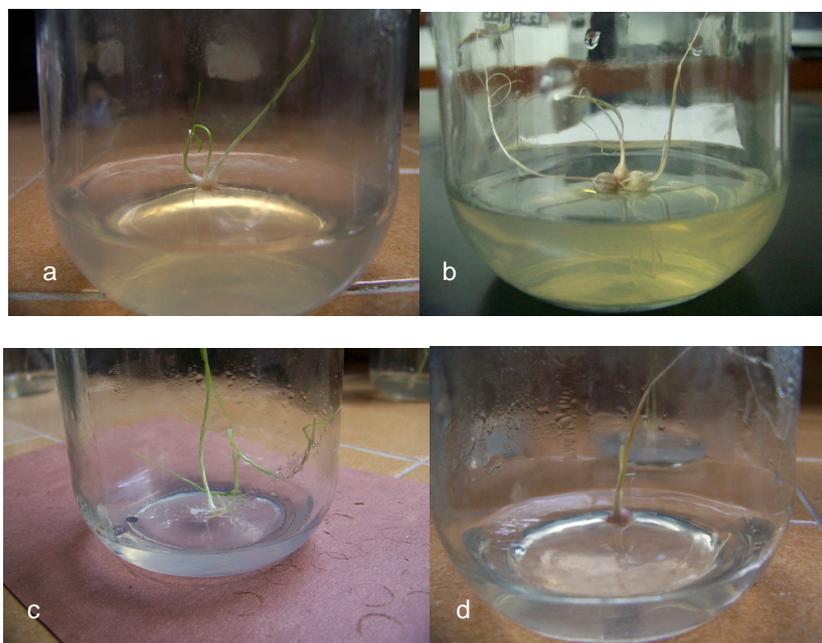


Figura 21. Proceso de inducción y formación de bulbos de ajo *Allium Sativum* bajo condiciones *in vitro*. (a y c) 15 días ddi en medio de cultivo LS suplementado con 90 g l⁻¹ de sacarosa. (b y d) formación de bulbos en cada brote luego de 30 ddi.

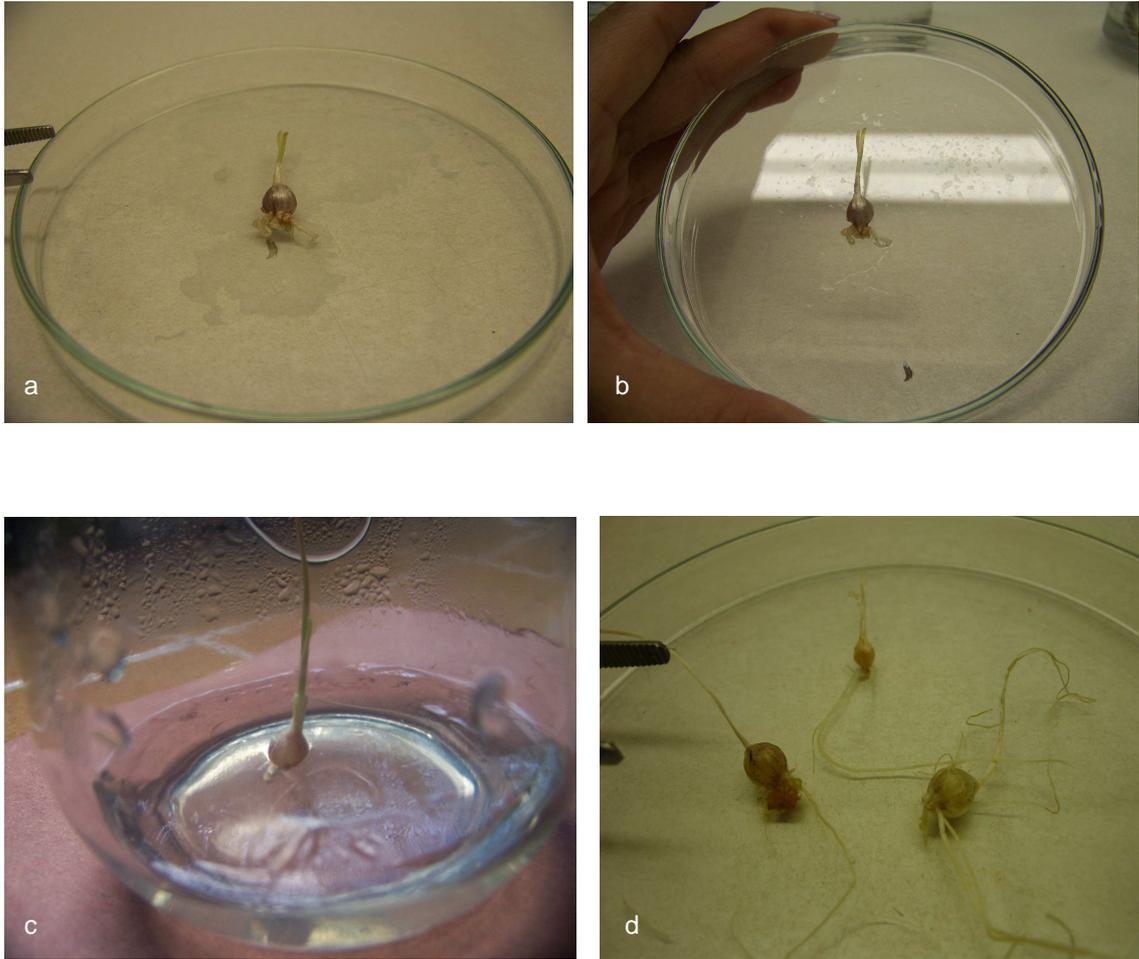


Figura 22. (a , b, c, d) Microbulbillos de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 30 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* en medio LS suplementado con 90 g l⁻¹ de sacarosa.

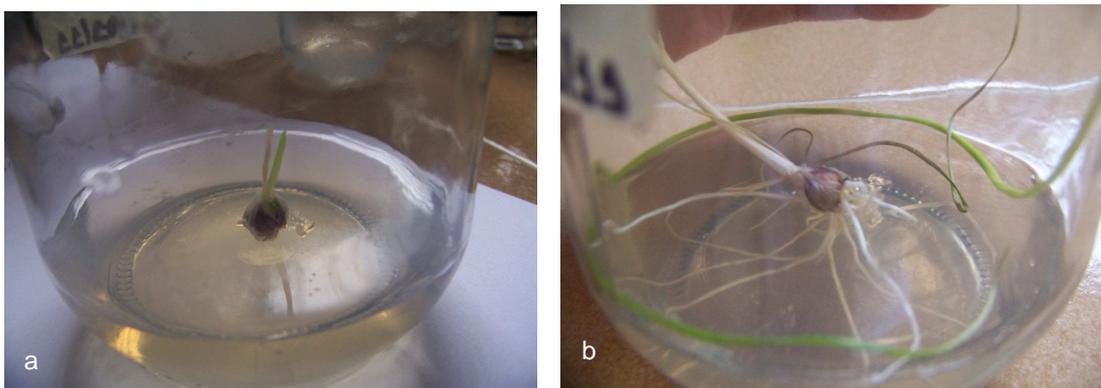


Figura 23. (a, b) Microbulbillos de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 60 días de su implantación bajo condiciones *in vitro* en medio LS suplementado con 90 g. l⁻¹ de sacarosa.

5.3. Aclimatización de los microbulbillos bajo condiciones de invernadero.

Variables cuantitativas:

5.3.1. Porcentaje de microbulbillos aclimatizados

El estadístico Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre los tratamientos. La aclimatización solo ocurrió en aquellos microbulbillos provenientes de medios de cultivo con una concentración 90 g l^{-1} de sacarosa. Este tratamiento presentó un porcentaje 100% de bulbos que superaron el paso de condiciones *in vitro* a *ex vitro* de manera satisfactoria (Cuadro 13). Esta respuesta puede atribuirse a que al momento de la aclimatización los microbulbillos mostraron el mayor diámetro ecuatorial y masa fresca a diferencia de aquellos provenientes de la concentración 60 g l^{-1} de sacarosa en el medio, donde no ocurrió aclimatización

Los resultados indican que a mayor desarrollo del bulbo en condiciones *in vitro* mayor es la probabilidad que se establezca y desarrolle en condiciones de invernadero. En relación a esto Moriconi (1997), señaló que a mayor tamaño del microbulbillo en condiciones *in vitro*, mayor será la sobrevivencia del material, mayor altura de planta y por consiguiente mayor tamaño del bulbo formado al final de la cosecha. El autor concluye que bulbillos mayores de 4 mm tienen mayor posibilidad de sembrarse, desarrollarse y formar bulbos semillas al final de la cosecha en invernadero.

Estos resultados coinciden parcialmente con los de Torres *et al.* (2005), quienes lograron niveles de aclimatización entre 73.4 y 100%, utilizando como sustrato la materia orgánica.

Cuadro 13. Efecto de la aclimatización de microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones de invernadero con el uso del sustrato Sunshine.

Concentración de sacarosa (g l ⁻¹)	Aclimatización de microbulbillos (%)
60	0
90	100

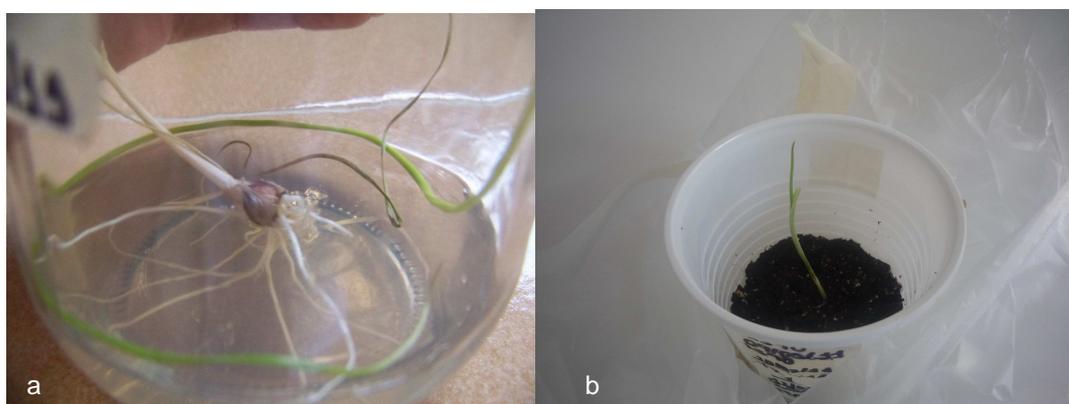


Figura 24. (a) Microbulbillos de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 60 días de su implantación bajo condiciones *in vitro*. (b) Planta de ajo (*Allium Sativum* L.) a los 10 días de siembra en sustrato bajo condiciones de invernadero



Figura 25. (a) Plantas de ajo (*Allium Sativum* L.) luego de 15 dds bajo condiciones de invernadero. (b) Planta ajo (*Allium Sativum* L.) luego de 25 dds bajo condiciones de invernadero.

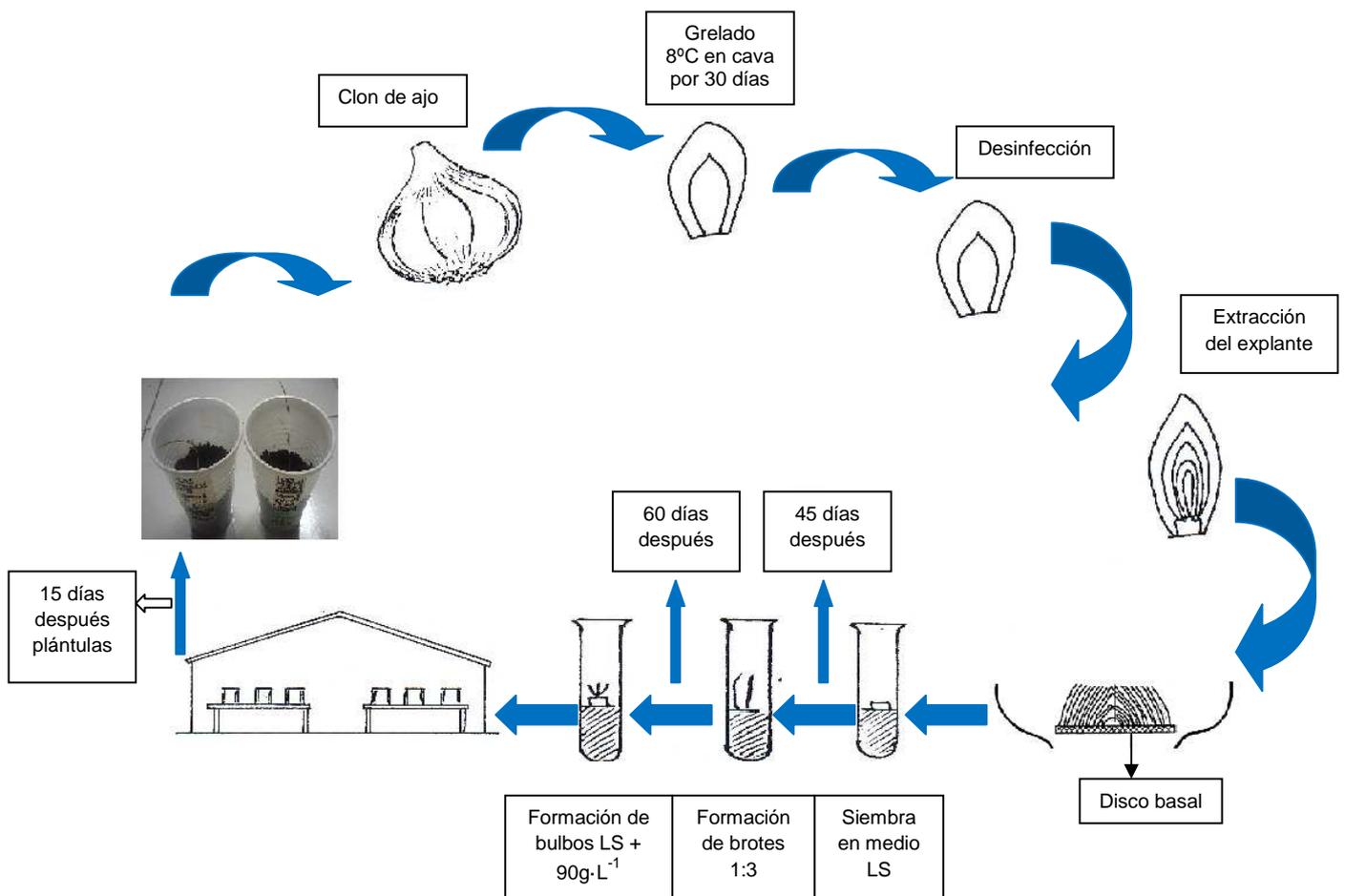


Figura 26. Esquema de la metodología desarrollado para la obtención masiva de semilla de ajo (*Allium sativum* L) libre de enfermedades, mediante el cultivo *in vitro* con el uso de explante de disco basal y medio de cultivo LS.

VII. CONCLUSIONES

- En la presente investigación se evidenció la posibilidad del uso de un medio de cultivo favorable y económico para la regeneración de plántulas de ajo sin el uso de reguladores de crecimiento.
- Representa el primer reporte de inducción y desarrollo de brotes de ajo (*Allium sativum* L.) a partir de explantes de meristemos apicales y discos basales con el uso de medios de cultivo libre de reguladores de crecimiento
- En la presente investigación se demostró la importancia de los discos basales como explantes potentes y altamente morfogénicos comparado con los explantes de meristemos apicales en la micropropagación de ajo (*Allium sativum* L.).
- Los explantes de discos basales mostraron mejor respuesta en relación a la emisión de un mayor número y altura de brotes que el explante de meristemo apical.
- Bajo condiciones *in vitro*, el mejor medio de cultivo para la inducción de brotes en ajo (*Allium sativum* L.) es el LS sin reguladores de crecimiento, independientemente del explante utilizado.
- Bajo condiciones *in vitro*, el medio de cultivo para la inducción de callos de ajo (*Allium sativum* L.) es el B5 sin reguladores de crecimiento, para el explante de meristemo apical.
- Se logró un aumento de la tasa de multiplicación, de 1:1 a 1:3 brotes/explante mediante el uso de un medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.

- La mayor inducción de microbulbillos en condiciones *in vitro* ocurrió en los brotes de ajo (*Allium sativum* L.) cuando el medio de cultivo fue suplementado con $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa sin el uso de reguladores de crecimiento.
- Los microbulbillos desarrollados en el medio suplementado con $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa sin el uso de reguladores de crecimiento, mostraron los valores más alto de diámetro ecuatorial y masa fresca.
- El mayor porcentaje de aclimatización bajo condiciones de invernadero ocurrió en aquellos microbulbillos que mostraron el mayor diámetro ecuatorial y masa fresca.
- El uso del cultivo de tejidos, permitió plantear una metodología promisoría, para la propagación masiva de semilla de ajo libre de enfermedades, en medios de cultivos económicos.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar molecularmente la uniformidad genética de los clones propagados *in vitro*, para obtener mayor información genética del cultivo.
- Evaluar morfológicamente en campo los clones propagados *in vitro*
- Evaluar la metodología planteada empleando clones de ajo uniformes en cuanto a características comerciales y de calidad del cultivo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, R. 1989. Control integrado de la pudrición blanca del ajo (*Sclerotium cepivorum*, Berk). Tesis de Maestría. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
- ALBARRACÍN, M.; C. BERBIN; A. ALARZE. 1994. Colección y Evaluación de Clones de Ajo 1992-1993. Informe. Instituto y Departamento de Agronomía. UCV.
- AYABE, M. Y S. SUMI. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep* 17:773–779.
- AYABE, M. Y S. SUMI. 2001. A novel and efficient tissue culture method, "stem-disc dome culture, for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 503–507.
- BREWSTER, J.L. 1994. Onions and other vegetables *Allium*. CAB International. 41p.
- BARANDIARAN, X; N. MARTIN; C. ALBA; M. F. RODRIGUEZ,.; A. DI PIETRO; J. MARTIN .1999. An efficient method for the in vitro management of multiple garlic accessions. *In Vitro Cell.Dev.Biol.- Plant.* 35:466–469.
- BURBA, J.L. 2003. Producción de ajo. Proyecto ajo/ INTA. 69: 23-43.
- BURBA, J.L. 2009. Mejoramiento genético y producción de "semilla" de ajo (*Allium sativum* L.). Posibilidades de adaptación a diferentes ambientes. *Revista Colombiana de ciencias hortícolas.* 1 (3): 28-44.
- CARRILLO.J.C.1995. Perspectivas de la Producción de Semilla de Hortalizas en Venezuela. *Fonaiap divulga* 18: 1-6.

- CARDENAS, M.L. 1995. Cultivo *in vitro* de brotes de "ajo" *Allium sativum* L. de tres variedades obtenidas en Marín, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León Universidad. Facultad de Ciencias Biológicas. 49 p.
- CEDEÑO, L; C. CARRERO; P. QUINTERO, H. ESPINOZA. .2003. *Stemphylium vesicarium*, causante de quema foliar en ajo y cebolla en Mérida, Venezuela. *Interciencia*. 28 (3): 173-178.
- CARDONA, L. y P. GONZALEZ. 2006. Obtención y caracterización de la oleorresina en ajo (*Allium Sativum* L.). Tesis de Pre-grado. Escuela de Química. Facultad de Tecnología. Universidad Tecnológica de Pereira.73p.
- CASTILLO.A. 2007. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*.INIA-Las Brujas.8p.
- FEDEAGRO.<http://www.fao.org/es/ess/top>.Revisado: 20/12/2012
- GAMBORG O, R. MILLER; K. OJIMA .1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root. *Cells* 50:151–158
- GERRITS, M. M.; G.J. DE KLERK. 1992. Dry-matter partitioning between bulbs and leaves in plantlets of *Lilium speciosum* regenerated *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.* 41:461-468.
- HUTSON, H Y K. DALE.1994.Propagaciòn de plantas. Principios Precticos.3ra Edición. México. 231p.
- HAQUE, M.S.; T. WADA; K. HATTORI. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 50:83–89.

- HIM, F.Y; J. PÁEZ. 1998. Origen histológico de los órganos regenerados *in vitro* del jengibre (*Zingiber officinale* R.). Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort. 42:110-118.
- IZQUIERDO, H. 2000. Propagación *in vitro* de genotipos cubanos de ajo (*Allium sativum* L.). Tesis de Maestría en Biología Vegetal. Universidad de La Habana. 92 p.
- IZQUIERDO, H; Y. QUIONES .2001. TEMAS .39-55p.
- JIMÉNEZ, M. A.; D. ULACIO; W. PERDOMO; E. BRICEÑO. 2009. Micobiota y nemátodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.). Bioagro 3 (21): 209-216.
- KIM, E.K.; E.J. HAHN; H.N. MURTHY; K.Y. PAEK. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures.Plant Cell Tissue Organ Cult 73:231–236.
- LINSMAIER, E.; F. SKOOG. 1965. Organic growth factor requirements for tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18:100–127.
- LA CRUZ. L; C. MOLINA; C. GAMICA. 1983. La Fertilización es una de las prácticas culturales indispensables para la obtención de cultivos de altos rendimientos. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). 8:1-3.
- MURASHIGE, T; F. SKOOG .1962. A revised medium for rapid growth and biosassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473–497.
- MARTINEZ, M. y Y. GRANADA. 1993. El bulbo del ajo y sus limitaciones fitopatológicas como semilla en el país. FONAIAP-Divulga. 10 (44):17-18.

- MESSIAEN, C ; J. LALLEMAND ; F. BRIAND. 1994. Varietal groups in garlic cultivars. *Acta Horticulturae*. 358:157-159.
- MOHAMED Y. Y.; W. E. SPLITTSTOESSER ; R. E. LITZ. 1994. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 36: 243-247.
- MOHAMED Y. Y; S.A. BARRINGER; W.E. Splittstoesser.1995. In vitro bulb production from *Allium* spp. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*31: 51–52.
- MYERS, J; P.W. SIMON .1998. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plants. *Plant Cell Rep* 17:726–730.
- MARTÍNEZ, A; M.A. Torres; A.J. Rodríguez; LLORENTE, Odalys. 2010. Efecto del precultivo en sacarosa sobre la bulbificación y la conservación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.). *Agrotecnia de Cuba*. 2 (34): 1-7.
- MORICONI, D; V. CONCI; S. NOME. (1990). Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. *FYTON*. Vol. 51(2): 145-151.
- MORICONI, D. 1997. Sistema de producción de “semilla” básica. 50 Temas sobre producción de ajo vol 2. Mendoza. Argentina. P 57-68.
- MORENO, B. y ACEVEDO. R. 2002. Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. *Rev Iberoam Micol* 19: 115-119.
- Molina, S. 2003. Caracterización morfológica e isoenzimática y evaluación de resistencia “in vivo” e “in vitro” a *Sclerotium cepivorum* en clones de ajo (*Allium sativum* L.) pertenecientes al banco de Germoplasma del Instituto de Agronomía. Tesis de

Maestría. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay.112p.

MUJICA, H.; M. MOGOLLÓN. 2004. Bulbificación in vitro del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. Biagro 16(1).55-60.

H. MUJICA; M.E. SANABRIA; N. MOGOLLÓN; Y. PEROZO. 2008. Formación *in vitro* del bulbo del ajo morado (*Allium sativum* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 25: 197-210.

FINOL. M.H. 2006. Micropropagación de Gloxinias (*Sinningia speciosa* Lodd.). Tesis de Pregrado.Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 72p.

NIMMI Y ; T. ONOZAWA .1979. *In vitro* bulblet from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. Sci. Hort. 11: 379–389

NAGASAWA, A.; J. FINER. 1998. Development of morphogenic suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 15:183–187.

NAGAKUBO, T.; A. NAGASAWA; H. OHKAWA .1993. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. Plant Cell Tissue Organ Cult 32:175-183

NAGAKUBO, T.; M. TAKAICHI; K. OEDA.1997. Micropropagation of *Allium sativum* L. (Garlic) In: Bajaj YPS (eds) High-tech and micropropagation. Biotechnology in agriculture and forestry 39: 3-19.

NÚÑEZ, M Y M. ROMÁN. 2008. Principios y recomendaciones para la producción de ajo en Los Andes venezolanos. INIA 3: 1-5.

PASCUAL, J. 1997. El arca de la biodiversidad. Ediciones. Celeste. 60 p.

PARDO, A Y C. MARÍN. 2003. Caracterización de cultivares de ajo en Cubiro, Estado Lara. Agronomía Tropical 53(4): 381-395.

- PARDO, A; A. HERNÁNDEZ; N.MÉNDEZ. 2009. Caracterización molecular de siete clones de ajo (*Allium sativum* L.) mediante la técnica RAPD. Bioagro 2 (21): 81-86.
- QUEZADA, J. A; M. E. ASCARRUNZ; M. A. SILVA. 1998. Evaluación del potencial de regeneración de ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) en el proceso de microbulbificación *in vitro*. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. p. 70.
- RAMOS, G. 1988. Experiencias en la Producción de semilla de Ajo en Mucuchíes, Estado Mérida. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). 30:1-4.
- RAMOS, G. 1991. El cultivo del ajo en el Estado Mérida. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). 10:1-6.
- ROBLEDO. A; V.M. VILLALOBOS; A. E. JOFRE .2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by roottip culture. *in vitro* cell dev BIOL-PLANT 36:416-419.
- RODRÍGUEZ, M; A.MORENO; M. MARTÍNEZ. 2001. Obtención de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de patógenos. 5as Jornadas de Investigación Universidad Autónoma de Zacatecas. Trabajo: AP/UAGRO-02/002. Disponible en <http://www.uaz.edu.mx>.
- RAMÓN, M.; M, NÚÑEZ. 2008. Familias virales presentes en cultivos de ajo del estado Mérida. INIA HOY 2:1-6.
- STIMART, D.P.; P.D. ASCHER.1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thumb. J.Am. Soc. Hort. Sci. 103: 180-184.

- GONZALEZ, H.1984. Obtención y propagación de plantas de ajo *Allium sativum* L. libres de virus, mediante el cultivo "in vitro" de ápices meristemáticos. Tesis de Maestría. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 100 p.
- SEABROOK, J. E. A. 1994. In vitro propagation and bulb formation of garlic. *Can. J. Plant Sci.* 74:155-158.
- SÁNCHEZ, A.1990. Uso de fertilizantes comerciales en la preparación de medios, para la producción in vitro de ajo *Allium sativum*. Tesis de Maestría. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. 100 p.
- SÁNCHEZ, T.1995. Evaluación del efecto de filtrados tóxicos de *Sclerotium cepivorum* sobre callos y microbulbillos "in vitro" de *Allium sativum*. Tesis de Maestría. Postgrado en Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. 99p.
- SHAHIDUL, M; T. WADA; K. HATTORI.1997.High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 50:83-87.
- TAKAGI, H .1990. Effect of nutrient, growth regulator and temperature for in vitro growth and organogenesis of excised buds from garlic cloves (in Japanese). *Bull Yamagata Univ Agric Sci* 11:187–200.
- TORRES, M.A; J. ALONSO; A. FONT, Y. MUÑOZ; M. ORTEGA; N. ARROZARENA; B. DIBUT; V. MOREN. 2005. Desarrollo y aclimatación de microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.) para la conservación de germoplasma. *Agrotecnia de cuba.* 1 (3): 1-5.

ULACIO, D; M. A. JIMÉNEZ; P. WILFREDO. 2011. Estrategias de manejo integrado de *Sclerotium cepivorum* berk. y la pudrición blanca del ajo en Carache, Estado Trujillo, Venezuela. *Bioagro* 23(2): 105-114. 2011.

ZEL, J.; R. DEBELJAK ; R. UCRAM; M. RAVNIKAR.1997.The effect of jasmonic acid,sucrosa and darkness on garlic(*Allium sativum*,L cv. Ptujski jesenski)bulb formation in vitro. *In vitro Cell.Dev.Biol. Plant* 33:231-235.

ZHENG, S.J; B. HENKEN; F.A. KRENS; C. KIK . 2003. The development of an efficient cultivar-independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 39:288– 292.