

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CULTIVO *in vitro* DE BROTES DE "AJO" *Allium sativum* L.
DE TRES VARIEDADES OBTENIDAS EN MARIN, N. L. MÉXICO.

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA

PRESENTA

MARIA LUISA CARDENAS AVILA

MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO DE 1995

TM

Z53

FCB

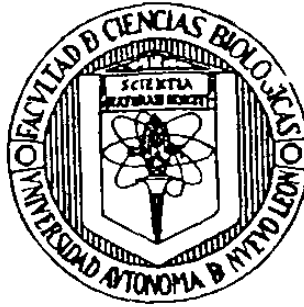
199

C37



1020112167

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**CULTIVO *in vitro* DE BROTES DE "AJO" *Allium sativum* L.
DE TRES VARIEDADES OBTENIDAS EN MARIN, N. L. MÉXICO.**

T E S I S

**QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA**

PRESENTA

MARIA LUISA CARDENAS AVILA

MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO DE 1995

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**CULTIVO *in vitro* DE BROTES DE "AJO" *Allium sativum* L.
DE TRES VARIEDADES OBTENIDAS EN MARIN, N. L. MÉXICO.**

T E S I S

**QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BOTANICA**

PRESENTA

MARIA LUISA CARDENAS AVILA

COMISION DE TESIS

PRESIDENTE:



M.C. TERESA ELIZABETH TORRES CEPEDA

SECRETARIO:



Ph.D., D.Sc. RATIKANTA MAITI

VOCAL:



M.C. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ

ASESOR EXTERNO:



DRA. MARIA ELIZABETH CARDENAS CERDA

MONTERREY, NUEVO LEON

JULIO DE 1995

DEDICATORIA

CON AMOR A LA MEMORIA DE MI PADRE:

SR. LUIS CARDENAS MATA

"Ese Señor de las canas ..."

ejemplo de trabajo y responsabilidad, quien vive y vivirá por siempre en mi corazón.

TE QUIERO PAPA

A MI MADRE:

SRA. JUANITA AVILA DE CARDENAS

Corazón familiar. Que me inculcó los mejores valores humanos, y quien ahora es mi padre y madre.

TE QUIERO DOBLEMENTE MAMA.

A MI ESPOSO CON AMOR:

SR. GABRIEL VALERO MARTINEZ

Por compartir su vida conmigo, por su comprensión, apoyo y paciencia, y sobre todo por el amor que nos une.

CON AMOR A MIS HIJAS:

VALERIA ALEJANDRA Y GABRIELA DEYANIRA

Pilares de mi existencia.

Y a aquella pequeña almita, que conserva un lugar muy especial en mi corazón.

A MIS HERMANOS:

BERTHA ELIA, BEATRIZ ELENA, BLANCA ESTHELA, BELINDA ESTHER, MARIA CONCEPCION, LUIS ALBERTO, JUANA MARIA Y FRANCISCO JAVIER.

Con el cariño fraternal que nos une.

CON CARÍÑO:

A MIS HERMANOS POLITICOS Y SOBRINOS.

A LA FAMILIA VALERO MARTINEZ

CON APRECIO Y GRATITUD.

AGRADECIMIENTOS

A los maestros integrantes de la comisión de tesis:

M.C. Teresa Elizabeth Torres Cepeda, por la dirección de esta tesis, sugerencias y la revisión del escrito.

Al Dr. Ratikanta Maiti, por su orientación y consejos durante el desarrollo del presente trabajo, así como contribuir en mi formación profesional.

Al M.C. Roberto Mercado Hernández, por su valiosa asesoría en la parte estadística, por sus sugerencias, así como su disposición para llevar a buen término el presente trabajo.

A los maestros de la Fac. de Agronomía de la U.A.N.L. Dra. María Elizabeth Cárdenas Cerda, director externo, por permitirme colaborar en su proyecto; proporcionar literatura, orientación, sugerencias y revisión de este trabajo; e Ing. M.Sc. Fermín Montes Cavazos, por proporcionar las variedades de ajo utilizadas en esta investigación.

En forma muy especial al Dr. Luis J. Galán Wong, por el impulso y apoyo brindados desde el inicio, y durante el desarrollo de mis estudios de maestría.

Al Dr. Rolando Peña, por su colaboración en la elaboración del anteproyecto de tesis.

Al Biól. Jorge Verduzco Martínez, Jefe del Dpto. de Fisiología Celular y Genética y al Dr. Mario Morales Vallarta Jefe del Laboratorio de Biología Celular de la F.C.B. por las facilidades otorgadas para la realización de estudios y tesis de maestría.

Al Biól. Javier Saucedá Méndez por las fotografías de la fase experimental.

A los maestros y compañeros de trabajo: Biól. Ma. Eufemia Morales, Biól. Ramón Cavazos Gzz., Biól. Jaime Fco. Treviño Neávez, M.C. Jorge A. Villarreal Gza., Biól. Ma. Guadalupe Martínez, M.C. Libertad Leal Lozano, Q.B.P. Irma Portillo Rdz., Biól. Ma. del Socorro Baéz, Biól. Homero García Curiel, Biól. Carlos García Arizpe y Sra Adriana Macías de Reyna, por el apoyo recibido y por hacerme sentir como en casa.

A los maestros Biól. José Luis Gutierréz Lobatos, M.C. Leticia Villarreal Rivera y M.C. Salomón Martínez Lozano, por el apoyo brindado durante el transcurso del trabajo.

A mis amigos y compañeros de estudios de maestría, Biól. María Concepción Valades Cerda, M.C. Sergio Moreno Limón y Biól. José Gpe. Almanza Enríquez por su apoyo incondicional, palabras de aliento y entusiasmo, y sobre todo por su invaluable amistad.

Al Biól. Alberto Contreras Arqueta y al Sr. Guillermo Pérez Rdz. por su participación en la edición del presente trabajo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo:

MUCHAS GRACIAS.

INDICE

CONTENIDO:	PAGINA
LISTADO DE CUADROS	viii
LISTADO DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
LITERATURA REVISADA	4
Importancia Medicinal	4
Cultivo de Tejidos Vegetales	4
<i>Cultivo de Brote Apical</i>	6
Balance de Reguladores de Crecimiento	6
Inducción de Bulbos	8
Técnicas Asépticas	9
Desinfestación	10
ORIGINALIDAD	11
HIPOTESIS	11
METODOLOGIA	12
RESULTADOS Y DISCUSION	18
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
LITERATURA CITADA	43

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Sales básicas del medio de cultivo Murashige-Skoog, 1962 (MS).	15
Cuadro 2. Sales básicas del medio básico Gamborg, Miller & Ojima, 1968 (BS).	15
Cuadro 3. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Inicial de Brote en cada uno de los 18 Tratamientos.	22
Cuadro 4. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Final de Brote en cada uno de los 18 Tratamientos.	23
Cuadro 5. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Diferencia entre Longitud Final menos Longitud Inicial de Brote en cada uno de los 18 Tratamientos.	23
Cuadro 6. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Número de Hojas en cada uno de los 18 Tratamientos.	24
Cuadro 7. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Peso Fresco en cada uno de los 18 Tratamientos.	24
Cuadro 8. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Inicial de Brote en cada una de las Variedades de <i>Allium sativum</i> L.	25
Cuadro 9. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Final de Brote en cada una de las Variedades de <i>Allium sativum</i> L.	25
Cuadro 10. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Diferencia entre Longitud Final de Brote menos Longitud Inicial de Brote en cada una de las Variedades de <i>Allium sativum</i> L.	25
Cuadro 11. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Número de Hojas en cada una de las Variedades de <i>Allium sativum</i> L.	26
Cuadro 12. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Peso Fresco en cada una de las Variedades de <i>Allium sativum</i> L.	26
Cuadro 13. Análisis de varianza, para los tratamientos, las variedades y la interacción de estas, a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	31
Cuadro 14. Análisis de varianza factorial de las variedades estudiadas para los medios de cultivo, las variedades y su interacción, a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	31

Cuadro 15. Valores de F calculada del Análisis de Varianza Factorial (Variedad-Medio de cultivo-Acido Indolacético (IAA)-Cinetina (K) =3x2x3x3) para la variable Diferencia entre longitud final de brote menos longitud inicial de brote, a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	33
Cuadro 16. Tabla de valores de X^2 para la presencia de Raíz y Bulbo con respecto a los tratamientos a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	38
Cuadro 17. Tabla de valores de X^2 para la presencia de Raíz y Bulbo con respecto a las Variedades de <i>A. sativum</i> L. a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	38
Cuadro 18. Tabla de valores de la prueba de Pearson R para la presencia de raíz y bulbo con respecto a los tratamientos a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	39
Cuadro 19. Tabla de valores de la Prueba de Pearson R. para la presencia de Raíz y Bulbo con respecto a las variedades de <i>A. sativum</i> L. a ocho semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	39
Cuadro 20. Tabla de valores de la Prueba de $X(2)$ para la presencia de raíz y bulbo con respecto a los Tratamientos a veinte semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	39
Cuadro 21. Tabla de valores de la Prueba de X^2 para la presencia de raíz y bulbo con respecto a las variedades de ajo (<i>A. sativum</i> L.) a veinte semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	39
Cuadro 22. Tabla de valores de la Prueba de Pearson R para la presencia de raíz y bulbo con respecto a los Tratamientos a veinte semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	40
Cuadro 23. Tabla de valores de la Prueba de Pearson R. para la presencia de raíz y bulbo con respecto a las variedades de <i>A. sativum</i> L. a veinte semanas del cultivo <i>in vitro</i> .	40

LISTADO DE FIGURAS

- Fig. 1. Bulbo de *Allium sativum* L. A) Variedad Cadereyta, B) Variedad Celaya y C) Variedad Taiwan. 13
- Fig. 2. Brotación de dientes de ajo en agar-agar. Variedad Taiwan: A) Brote y B) Raíces. 19
- Fig. 3. Desarrollo de raíces en plántulas de ajo *in vitro* a 8 semanas del cultivo: A) Variedad Cadereyta (M.S. con 0.01 mg.l⁻¹ IAA y 1 mg.l⁻¹ de K), B) Variedad Celaya (M.S. con 0.03 mg.l⁻¹ IAA y 1 mg.l⁻¹ de K). 21
- Fig. 4. Inicio de formación de bulbo a 8 semanas del cultivo *in vitro*: A) Variedad Cadereyta (1 mg.l⁻¹ de K y sin IAA), B) Variedad Taiwan (0.01 mg.l⁻¹ de K y sin IAA). 21
- Fig. 5. Longitud inicial de Brote (mm) para cada una de las variedades. 28
- Fig. 6. Longitud final de Brote (mm) para cada uno de los tratamientos. 28
- Fig. 7. Máximo crecimiento de brote (LFB-LIB) a 8 semanas del cultivo *in vitro*. A) Variedad Cadereyta en M.S. con 0.03 mg.l⁻¹ de IAA y sin K; B) Variedad Celaya en medio B5 con 0.03 mg.l⁻¹ de IAA y 0.1 mg.l⁻¹ de K). 30
- Fig. 8. Diferencia entre longitud final menos longitud inicial de brote para cada uno de los tratamientos. 32
- Fig. 9. Número de hojas para cada uno de los tratamientos. 32
- Fig. 10. Peso fresco (g) para cada uno de los tratamientos. 34
- Fig. 11. Peso fresco (g) para cada una de las variedades. 34
- Fig. 12. Bulbo definido a 12 semanas de inicio del cultivo *in vitro* en medio M.S. con 1 mg.l⁻¹ de K y sin IAA en las variedades: A) Cadereyta, B) Celaya y C) Taiwan. 36
- Fig. 13. Formación de doble bulbo a 20 semanas del cultivo *in vitro*. A) Variedad Cadereyta; B) Variedad Celaya en M.S. con 0.03 mg.l⁻¹ de IAA y sin K; C) Variedad Celaya en M.S. con 0.03 mg.l⁻¹ de IAA y 1 mg.l⁻¹ de K. 37

RESUMEN

Con el propósito de determinar el medio de cultivo y la concentración de reguladores de crecimiento óptimos que proporcionen la máxima tasa de crecimiento del cultivo *in vitro* en tres variedades de "ajo" (*Allium sativum* L.) Cadereyta, Celaya y Taiwan se probaron los medios de cultivo de Murashige-Skoog (MS)(1962) y Gamborg, Miller y Ojima (B5)(1968); adicionados con vitaminas, sacarosa y las combinaciones de tres niveles de Auxina (IAA) 0.0, 0.01 y 0.03 mg/l y tres niveles de Cinetina (K) 0.0, 0.1 y 1.0 mg/l en cada uno de ellos. Se diseñó un arreglo factorial de 18 tratamientos y 12 repeticiones para cada variedad, con un total de 648 unidades experimentales. El inóculo consistió del disco basal, región meristemática y dos primordios foliares. Las variables evaluadas por Análisis de Varianza después de 8 semanas de realizado el cultivo *in vitro* fueron: Longitud Inicial de Brote, Longitud Final de Brote, Diferencia entre Longitud Final menos Longitud Inicial de Brote, Número de Hojas y Peso Fresco. Y las variables Presencia o Ausencia de Raíz y Presencia o Ausencia de Bulbo a 8 y 20 semanas del cultivo *in vitro* por las pruebas no paramétricas X^2 (Tabla de Contingencia) y Correlación (Pearson R) con significancia $p < 0.05$. Para la Longitud Final de Brote y la Diferencia entre Longitud Final menos Longitud Inicial de Brote, el ANOVA mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) en los tratamientos 7 (0.03 mg/l de IAA y sin K), 9(0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K) y 17 (0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K). Para el Número de Hojas en los tratamientos 7 y 17; y para Peso Fresco en el 7 y 9. También existe diferencia significativa en la variedad Taiwan con respecto a la variable Peso Fresco. Las pruebas no paramétricas muestran que hay Dependencia y Asociación significativa para la variable Presencia de Raíz a 8 y 20 semanas del cultivo; y Presencia de Bulbo a 20 semanas con respecto a los tratamientos. Se concluye que los tratamientos 7 (0.03 mg/l de IAA y sin K) y 9 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K) del medio de cultivo MS y el tratamiento 17 (0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K) del B5 son los óptimos para las variables mencionadas.

INTRODUCCION

El ajo constituye un cultivo de importancia económica ya que es ampliamente utilizado como condimento y por sus propiedades medicinales.

Se caracteriza por presentar exclusiva propagación agámica por carecer de semilla botánica; para su producción se utilizan los bulbos (Conci *et al.*, 1986; Bustamante y Muñoz, 1993; Nagakubo, *et al.*, 1993).

En México, la zona del Bajío es una de las principales productoras debido a las condiciones climáticas prevalcientes. Además, se cultiva exitosamente en los estados de Aguascalientes, Sonora, Baja California y Nuevo León (García, 1983).

La producción de ajo en el estado de Nuevo León, constituye una actividad agrícola de acentuado interés económico, por lo que es importante obtener altos rendimientos y bulbos de buena calidad, determinada ésta en gran medida por el tamaño y el número de dientes por bulbo, características que adquieren importancia en el mercado de exportación, al exigirse ajo de bulbo grande con número reducido de dientes (Heredía *et al.*, 1987). Los principales municipios que siembran ajo son Cadereyta, Allende, Montemorelos y General Terán (zona centro del estado). Entre las principales limitantes de este cultivo cabe destacar la falta de producción de "semilla" certificada, altos costos de producción por la adquisición y manejo del bulbo-semilla (López, 1992), ya que es afectado por la presencia de virus y nemátodos (Wageman, 1991), los cuales, con las prácticas tradicionales son difíciles de erradicar.

Las diversas técnicas de Biotecnología Vegetal pueden complementarse adecuadamente para obtener plantas sanas y realizar su micropropagación, la cual consiste en el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial en condiciones asépticas a partir de porciones muy pequeñas de plantas tales como embriones, tallos, meristemos, células individuales, etc. (Hartman y Kester 1987).

Se han efectuado investigaciones tendientes a la obtención de plantas sanas de *Allium sativum* L. y su micropropagación vía organogénesis, proliferación de yemas adventicias e inducción de embriogénesis somática.

El cultivo *in vitro* de Brote Apical se utiliza como una herramienta de gran ayuda en la micropropagación vegetativa, la cual permite la multiplicación acelerada del material y su intercambio, sin la necesidad de controles sanitarios para prevenir introducción de plagas y enfermedades, así como para la limpieza de patógenos, especialmente de virus y micoplasmas, en plantas de interés y muy aplicadas en aquellas cuyos bulbos, cormos, raíces y tubérculos son comestibles y su multiplicación es exclusivamente vegetativa.

La falta de estudios sobre cultivo *in vitro* de brotes apicales de ajo de las variedades usadas en el Estado de Nuevo León y la importancia económica que este cultivo representa, hace necesario investigaciones tendientes a establecer las bases técnicas y científicas para su propagación masiva *in vitro*, así como definir las metodologías y los mecanismos para su aplicación que permitan en un futuro la obtención de plantas libres de nemátodos.

OBJETIVOS

Para el desarrollo del presente trabajo se plantearon los objetivos siguientes:

- 1.- Establecimiento aséptico del cultivo *in vitro*.
- 2.- Determinar el medio de cultivo adecuado para la proliferación de brote.
- 3.- Determinar la combinación óptima de reguladores de crecimiento que promuevan la máxima tasa de crecimiento del cultivo *in vitro*.

LITERATURA REVISADA

IMPORTANCIA MEDICINAL

Desde hace muchos años el hombre ha empleado el ajo para tratar una gran diversidad de enfermedades, desde el reumatismo y la gota, hasta afecciones gastrointestinales, las parasitosis, las picaduras de animales ponzoñosos y las afecciones de la piel. Martínez (1954), menciona que es usado oralmente como antidisentérico, antipirético, para la arterioesclerosis, estimulante, hipotensor, antipalúdico y broncodilatador. Por su parte, Cabrera (1952), lo recomienda además como antiséptico intestinal y catártico. Así mismo, la Sociedad Farmacéutica de México (1952), lo cita como antitusígeno y eupéptico. Otros usos son los de normalizar el funcionamiento del hígado, riñones y vesícula biliar, según García (1974). González y González (1979), indican su uso contra las reumas y dolores ciáticos y externamente para reblandecer callosidades. Así mismo, Luna (1987), menciona al ajo como estimulante, diurético, contra fiebres malignas, el cólera, difteria y como excelente remedio contra la hidrofobia. Al exterior sirve contra la tiña y la sarna.

Recientemente se ha utilizado el extracto concentrado fresco de ajo (ECFA), en pruebas de inhibición del crecimiento *in vitro* contra diferentes especies de hongos como: *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, causantes de infecciones muy severas; y éstos han resultado susceptibles al extracto (Acosta *et al.*, 1993).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales es una de las técnicas asociadas con la Biotecnología (Armstrong, 1985; Hussey, 1983). La capacidad de regeneración de las plantas distingue al cultivo de tejidos vegetales de los cultivos de tejidos animales. Este atributo es también la base de sus aplicaciones en la agricultura, las cuales actualmente incluyen una rápida propagación clonal, avance en el mejoramiento de plantas y eliminación de patógenos (Murashige, 1974 y 1984; Kartha, 1981).

Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido aplicadas en varias especies del género *Allium*, como es el caso de la especie *sativum* la cual se propaga vegetativamente ya que carece de

semilla botánica. Esto trae como consecuencia serios problemas de enfermedades sistémicas, así como también la presencia del nemátodo *Ditylenchus dipsaci* (Kuhin), el cual provoca importantes pérdidas en el rendimiento (Havranek, citado por Conci *et al.*, 1986), dado que es uno de los nemátodos más destructivos de plantas (Wageman, 1991), tales como: cebolla, narciso, jacinto, tulipán, avena, centeno, trébol rojo y fresa.

D. dipsaci es un parásito interno de bulbos, tallos y hojas y pasa de generación en generación a través de estos tejidos, escapando al suelo sólo cuando las condiciones de vida en los tejidos de la planta, resulten desfavorables (Agrios, 1988).

Shain y Kanenko (1986), han logrado obtener desde cultivo de callo hasta regeneración completa de plantas del género *Allium*. Entre los diversos tipos de explante que han sido utilizados para el establecimiento de este cultivo se puede mencionar hoja (Flick *et al.*, 1983; López, 1992); meristemo (Debergh y Maene, citados por Tisserat, 1985) y (Conci *et al.*, 1986), así como brácteas, brotes apicales (Lassocinski *et al.*, 1985), y receptáculo floral (Rauber y Grunewaldt, 1988). Phillips y Hubstenberg (1987), realizaron micropropagación y regeneración *in vitro* a partir de callo de las mas importantes especies de *Allium*.

Por su parte Phillips y Luteyn (1983), mediante el cultivo de callo en *Allium spp.*, exploraron la posibilidad de usar la variación somaclonal en programas de mejoramiento, debido a su capacidad de regenerar plantas enteras a partir de cultivo de tejidos. Lo anterior es factible puesto que Shahin y Kanenko (1986), con especies del género *Allium* a partir de cultivo de callo, indujeron la formación de embriones y posteriormente obtuvieron regeneración de planta completa, cultivaron miles de plantas para su madurez, se autopolinizaron y las semillas resultantes se sembraron en campo para su evaluación posterior.

Así mismo, Van der Valk *et al.*, (1992), indujeron a partir de callo (derivado de embrión cigótico), la formación de embriones somáticos y estimularon la formación de vástagos de 12 variedades de 3 especies del género *Allium*. Por su parte Rauber y Grunewaldt (1988), utilizaron diversos tipos de explante (hoja y receptáculo floral), encontrando que la habilidad para regeneración de brote está controlada fuertemente por el genotipo.

CULTIVO DE BROTE APICAL.

El cultivo de brote apical ha sido el método empleado más ampliamente ya que es excelente para liberar al material vegetal de patógenos sistémicos y la conservación de diferentes tipos clonales de interés regional, sin exponerlos a los riesgos y costos que significarían mantenerlos *in vivo* Conci *et al.*, (1986).

Este método consiste en utilizar un explante que oscila entre 0.1 a 20 mm. de longitud y consta del meristemo apical del brote con 1 a 3 primordios foliares (Murashige, 1974; Lozoya, 1985).

Mori, citado por Quak (1977) y Murashige (1978), consignan a *Allium sativum* L., como un ejemplo de planta liberada de un patógeno específico, en este caso el virus del mosaico del ajo.

Havranek y Novak citados por Narayanaswamy (1977), obtuvieron brotes y plántulas a partir de cultivo de meristemas, similarmente Debergh y Maene, citados por Tisserat (1985), obtuvieron proliferación de brotes axilares a partir del mismo explante. Sin embargo la dimensión y el número de primordios foliares son un factor importante para la regeneración. Daniels *et al.*, citados por Conci *et al.*, (1986), obtuvieron en explantes con un primordio foliar un 30% de prendimiento, mientras que con 2 primordios fue de un 70%.

BALANCE DE REGULADORES DE CRECIMIENTO

Un balance adecuado de auxinas y citocininas *in vitro*, induce la formación de yemas y/o raíces, dependiendo de la concentración de ambas y de la especie en que están actuando, lo que implica que las hojas jóvenes son capaces de producir las auxinas necesarias para el desarrollo adicional de la raíz, y que cuando maduran, sintetizan citocininas que promueven la formación de brotes, ya sean primordios y hojas o yemas laterales (la principal fuente de citocininas son las raíces). La relación auxina-citocinina *in vitro* es indispensable para la morfogénesis de los meristemas, por lo que las investigaciones actuales se centran en encontrar la concentración óptima, tanto de auxina como de citocinina, tomando en cuenta las variaciones de respuesta interespecífica que presentan los vegetales (Hurtado y Merino, 1988). Un coeficiente auxina/citocinina menor que la unidad favorece la formación de raíces; esta relación puede

modificarse en favor de las citocininas sin alterar la concentración de una u otra, al introducir un simple inhibidor de auxina inclinando la balanza a favor de las citocininas (Murashige-Skoog, 1962).

Al comparar la habilidad de 5 auxinas para la inducción de callo de hojas jóvenes y tejidos de meristemo de ajo (*A. sativum* L.) Nagasawa y Finer (1988), encontraron que la más efectiva fue el 2,4-D (0.1- 3.0 mg/l) y 2,4-T (0.1- 0.3 mg/l). Matsubara y Chen (1989), estudiaron los efectos del ANA y BA sobre el vigor de plántulas de ajo, obtenidos de ápices de tallo *in vitro* y su aclimatación en campo. A 60 días del cultivo, el crecimiento de las plántulas fue normal y vigoroso cuando fueron producidas en medio MS con NAA y BA, ambos a 0.01mg/l.

Al trabajar el medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) y diversos cultivares de ajo, Conci *et al.*, (1986) mencionan que las respuestas varían dependiendo del cultivar; su medio más adecuado contenía 0.1 mg/l de AIA y 0.1 mg/l de Cinetina; de igual manera Lassocinski *et al.*, (1986), aplicaron la técnica de cultivo de brotes y mencionan que el mejor crecimiento de los explantes se obtuvo con el medio de Gamborg suplementado con 1 mg/l de BA y sin Auxina o bien 1.0 mg/l de Cinetina y 0.1 mg/l de ANA.

Bovo y Mroginski (1985), mencionan que la adición de 100 mg/l de mio-inositol en MS suplementado con 0.1 ó 0.01 mg/l de ANA duplicó el porcentaje de meristemos de ajo que dan plantas enteras, en cambio la adición de AG (Acido Giberélico) tuvo un efecto opuesto.

Plaper *et al.*,(1991), indican que una concentración de 0.1 μ M de Ac. Jasmónico (JA) estimula el desarrollo de yemas aisladas de ajo (*Allium sativum* L. c.v. Ptuj), después de 2 semanas de cultivo. Sin embargo, las yemas en un medio con 10 μ M de JA fueron retrasadas en crecimiento.

Bustamante y Muñoz (1993), en investigaciones sobre cultivo *in vitro* de ajo en medio MS conteniendo cinetina (K) o benziladenina (BA) en 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l + 0.1 mg/l de Ac. Naftalenacético (NAA), encontraron que el porcentaje de explantes con brotes y el número de brotes por explante fueron más altos con BA que con K y el control (sin reguladores de crecimiento); sin embargo la longitud de la hoja, el porcentaje de explantes con raíces y el número de raíces por explante fueron superiores con K que con BA y el control. Sin embargo,

morfológicamente las plantas fueron superiores con K, especialmente en las más bajas concentraciones.

INDUCCION DE BULBOS.

Las variedades comerciales de ajo (*Allium sativum* L.) son propagadas vegetativamente debido a su esterilidad sexual, tomando muchos años para producir un número suficiente de bulbos-semillas para prácticas de cultivos de una nueva variedad; además algunos virus son transmitidos a través de bulbo-semilla (Nagakubo *et al.*, 1993). Las plantas libres de virus producidas a través de cultivo de ápice de brote son útiles para mejorar la producción y calidad del cultivo (Bhojwani y Bhojwani *et al.*, citados por Nagakubo *et al.*, 1993).

La formación de bulbillos *in vitro* de ajo ha sido reportado por diversos investigadores tales como Abo El-Nil; Bhojwani *et al.*; Moriconi *et al.*, citados por Nagakubo *et al.*, (1993) y por Matsubara y Chen (1989).

Un procedimiento para regeneración de brotes y bulbos *in vitro* de ajo y chalote es descrito por Yasseen *et al.*, (1993,1994). Los brotes apicales fueron sometidos a 3 o 4 cortes longitudinales a través del plano meristemático desde la base hacia el ápice. Los explantes fueron cultivados en medios de Murashige Skoog (MS) conteniendo 4.4 μM de Benziladenina (BA) o 0.15 μM de Thidiazuron (TDZ) y 1.2 μM de Ac. Indol Butírico (IBA). Los brotes apicales sujetos a corte produjeron cerca de 9 brotes mientras que los explantes no cortados (testigos) produjeron 1 ó 2 brotes. Los brotes regenerados fueron inducidos a bulbos en MS conteniendo 5 gr/l de Carbón activado y 120 gr/l de Sacarosa bajo fotoperíodo de día largo. Los bulbos formados *in vitro* fueron transferidos a suelo sin aclimatación y produjeron plantas viables.

Matsubara y Chen (1989), lograron formación de bulbo a partir de plántulas de ajo obtenidas *in vitro* por ápices de tallo, después de 60 días de transferidas a un medio conteniendo NAA y BA en concentraciones iguales al medio inicial (ambos a 0.01 mg/l ó NAA a 0.1 mg/l y BA a 0.01 mg/l); los bulbos pequeños fueron subcultivados en los mismos medios de cultivo obteniéndose plantas después de 50 días de aclimatación bajo condiciones de 20°C con 16 horas luz: con lo cual el porcentaje de sobrevivencia fue de 30 a 50 en perlita.

TECNICAS ASEPTICAS

La importancia del mantenimiento de un medio ambiente estéril es fundamental durante el cultivo de tejidos vegetales para evitar la contaminación microbial, por lo cual; es necesario el uso de varias técnicas empleadas para la esterilización de cristalería, instrumentos quirúrgicos, líquidos y material vegetal.

Los métodos pueden ser clasificados como sigue: calor seco, calor húmedo, ultrafiltración y esterilización química (Dodds y Roberts, 1986).

En el presente trabajo se procedió a la esterilización mediante el calor húmedo. Este procedimiento emplea una autoclave operada con vapor bajo presión. Una olla de presión casera puede ser usada. Para la esterilización de productos de papel, cristalería, instrumentos y volúmenes de líquido que no excedan de 50 cc por contenido, una presión de vapor de 15 lb. a una temperatura de 121°C (250°F) es aplicada por 15 minutos. El tiempo mínimo de esterilización aumenta con un incremento en el volumen de líquido. Por ejemplo, con éstas condiciones de presión y temperatura 75 cc de líquido, por recipiente, requiere 20 minutos, de 250 a 500 cc requiere 25 min y un periodo de 30 min es necesario para 1000 cc (Biondi y Thorpe, citados por Dodds y Roberts 1986).

El tiempo prolongado de autoclave debe ser evitado, debido a que produce la descomposición de los compuestos presentes en el medio.

Después de la autoclave, los objetos deberán ser colocados en estufa de secado ($T < 60^{\circ}\text{C}$) por un tiempo breve a fin de evaporar la humedad condensada. El vapor en la cámara de la autoclave debe penetrar el material. Una temperatura de 121°C por sí misma no puede lograr la esterilización. Con la excepción de los matraces, el resto del material deberán ser envueltos en papel. Aunque las laminillas de aluminio son comunmente usados como una envoltura, éste es impermeable a la corriente de vapores y por lo tanto no es recomendable (Hamilton, citado por Dodds y Roberts, 1986).

Otro de los calores húmedos de la esterilización es un baño de agua hirviendo. Los artículos son colocados en agua hirviendo conteniendo Carbonato de Sodio (2 % w/v) por 20 min. Todos los microorganismos vegetativos podrían ser destruídos, aunque unas pocas esporas altamente resistentes podrían sobrevivir al tratamiento (Hamilton; Collins y Lyne, citados por Dodds y Roberts, 1986).

DESINFESTACION

Los métodos de desinfestación pueden excluir todos los microorganismos no infecciosos asociados superficialmente, esto es importante porque todos los medios empleados contienen nutrientes que facilitan el crecimiento de bacterias y hongos, y la asepsia es fundamental para el cultivo de Tejidos Vegetales (Dodds y Roberts, 1986).

Hurtado y Merino (1988), publicaron que el material vegetativo contiene en la superficie una abundante microflora que debe ser eliminada por medio de una desinfestación antes del corte del tejido u órgano que será empleado como inóculo. El agente desinfestante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfestación, debe ser *determinado* empíricamente para el material vegetativo con el que se trabaja. En general, casi siempre se usan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio (blanqueador casero), los cuales liberan al cloro como agente desinfestante activo. Las concentraciones empleadas son 0.1 a 2 y 2 a 10% respectivamente. También puede ser empleado el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), agua de bromo, nitrato de plata y cloruro de mercurio. Usualmente, antes de colocar el material vegetativo en contacto con el agente desinfestante, se sumerge en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos (dip), con lo cual se eliminan las grasas de las hojas y se permite una mejor penetración del agente desinfestante en el material.

La mayoría de los blanqueadores comerciales contienen un agente humectante, pero se recomienda emplear unas gotas de algunos de ellos como detergente líquido, por ejemplo "Tween". Los agentes desinfestantes posteriormente son eliminados por medio de varios lavados con agua destilada esterilizada.

ORIGINALIDAD

Ya que en la actualidad no existen estudios sobre cultivo *in vitro* de brotes de ajo de las variedades que se utilizan en el estado de Nuevo León, México, ésta investigación pretende establecer las bases técnicas y científicas para la propagación masiva *in vitro* de ajo, así como definir las metodologías y mecanismos para su aplicación que permitan en un futuro próximo la obtención de plantas libres de nemátodos.

HIPOTESIS

Las variedades de *Allium sativum* L. presentan respuestas distintas en los diferentes medios de cultivo en cada una de las etapas de la regeneración *in vitro*.

METODOLOGIA

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO.

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

El trabajo experimental comprendió el periodo de Octubre de 1992 a Septiembre de 1993.

MATERIAL EXPERIMENTAL

El material biológico utilizado en el presente trabajo fueron tres variedades de "ajo" (*Allium sativum* L.) Cadereyta, Celaya y Taiwan; proporcionadas por el proyecto Producción de semillas de Hortalizas de la Facultad de Agronomía, U.A N.L.

METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO

El desarrollo de la investigación comprendió cuatro fases:

Fase I.- ESTRATIFICACION (Período de Pre-enfriado)

Se "desgranaron" manualmente los bulbos de cada una de las variedades de ajo (Cadereyta, Celaya y Taiwan) y se les eliminó la membrana a los "dientes" (Fig. 1); éstos se colocaron en frascos limpios y se sometieron a una temperatura de aproximadamente 5°C (temperatura de refrigerador) por un período de 2 semanas de acuerdo a Reglas Internacionales para el Ensayo de Semillas (1959).

Fase II.- DESINFESTACION

1.- Los "dientes" se colocaron en una gasa y se sumergieron en etanol al 70% por 30 segundos.

2.- Se pasaron a una solución de Hipoclorito de Sodio comercial al 20% v/v y de 2 a 4 gotas de detergente no iónico tween 20 por 15 minutos.

3.- Se eliminó el agente desinfectante dentro de la Campana de Flujo Laminar y se enjuagó el material de 3 a 5 veces con agua destilada esterilizada.



Fig. 1. Bulbo de *Allium sativum* L.
A) Variedad Cadereyta
B) Variedad Celaya
C) Variedad Taiwan



Fase III.- BROTACION DEL "DIENTE" DE *Allium sativum* L.

El material desinfectado se sembró en recipientes de vidrio con capacidad de 120 ml., conteniendo como sustrato 30 ml. de agar al 0.7% esterilizado. El instrumental utilizado en la disección, fue flameado constantemente para asegurar las condiciones asépticas que deben prevalecer dentro de la campana de flujo laminar. Los recipientes se colocaron a luz y temperatura ambiente.

Fase IV.- AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE LOS BROTES DE *Allium sativum* L. *in vitro*.

Esta etapa del proceso consiste en la obtención del inóculo, esto es la región meristmática de la yema vegetativa, más dos primordios foliares; el cual fue obtenido en condiciones asépticas a partir del diente brotado. Los inóculos resultantes presentaban un color crema y el tamaño de ellos fue de 3 mm. de longitud en las variedades Cadereyta y Celaya, y de 4 a 5 mm. en la variedad Taiwan. Estos inóculos fueron sembrados en:

1).- Sales Básicas de Medio de Cultivo Murashige-Skoog (MS) (1962) (Cuadro 1), también llamado Medio Universal; adicionado con los compuestos orgánicos Mio-inositol 100 mg/l, Tiamina.HCl 0.4 mg/l, Ac. nicotínico 0.5 mg/l, Piridoxina.HCl 0.1 mg/l, Glicina 2.0 mg/l, Hemisulfato de Adenina 80 mg/l, Sacarosa 30 gr/l y las combinaciones de 3 niveles de los reguladores de crecimiento Ac. Indolacético (IAA) 0.0, 0.01 y 0.03 mg/l y de Cinetina (K) 0.0, 0.1 y 1.0 mg/l, 7 gr/l de Agar. El pH se ajustó a 5.7 con NaOH 0.1 N ó HCL 0.1 N previa adición al agar y se llevó a esterilizar en olla de presión a una temperatura de 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos.

2) Sales Básicas de Medio de Cultivo Gamborg, Miller y Ojima (1968), conocido también como B5 (Cuadro 2); adicionado con los compuestos orgánicos Mio-inositol 100 mg/l, Tiamina.HCl 0.4 mg/l, Ac. nicotínico 1.0 mg/l, Piridoxina.HCl 1.0 mg/l, Hemisulfato de Adenina 80 mg/l, Sacarosa 20 gr/l y las combinaciones de 3 niveles de los reguladores de crecimiento Ac. Indolacético (IAA) 0.0, 0.01 y 0.03 mg/l y de Cinetina (K) 0.0, 0.1 y 1.0 mg/l y 7 gr/l de Agar. El pH se ajustó a 5.5 con NaOH 0.1 N ó HCL 0.1 N previa adición al agar y se esterilizó en olla de presión a una temperatura de 121°C a 15 libras por 15 minutos.

Cuadro 1. Sales básicas del medio de cultivo Murashige-Skoog, 1962 (MS).

SALES		mg/l
MACROELEMENTOS		
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amonio	1650
KNO ₃	Nitrato de Potasio	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de Calcio	440
CaCl ₂	Cloruro de Calcio (Anhidro)	332
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnesio	370
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potasio	170
MICROELEMENTOS		
Na ₂ EDTA	EDTA-disódico	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato Ferroso	27.8
H ₃ BO ₃	Acido Bórico	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de Manganeso	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Zinc	8.6
KI	Yoduro de Potasio	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de Sodio	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de Cobre	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de Cobalto	0.025

Cuadro 2. Sales básicas del medio básico Gamborg, Miller & Ojima, 1968 (BS).

SALES		mg/l
KNO ₃	Nitrato de Potasio	2500
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de Calcio	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnesio	250
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Fosfato de Sodio	150
KI	Yoduro de Potasio	0.75
H ₃ BO ₃	Acido Bórico	3.0
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de Manganeso	10.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Zinc	2.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de Sodio	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de Cobre	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de Cobalto	0.025
Na ₂ EDTA	EDTA Disodico	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato Ferroso	27.8

La preparación de ambos medios se realizó con agua bidestilada.

Los cultivos se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 hrs. luz (lámpara de 39 watts) y a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

De las combinaciones de los 3 niveles de Auxina (IAA) y de Cinetina (K) en los dos medios de cultivo (MS y B5) se obtuvieron 18 tratamientos, quedando estos de la siguiente manera:

TRATAMIENTO	SALES BASICAS MEDIO DE CULTIVO		REGULADOR DE CRECIMIENTO			
			IAA mg/l		K mg/l	
1	MS	+	0.0	+	0.0	
2	MS	+	0.0	+	0.1	
3	MS	+	0.0	+	1.0	
4	MS	+	0.01	+	0.0	
5	MS	+	0.01	+	0.1	
6	MS	+	0.01	+	1.0	
7	MS	+	0.03	+	0.0	
8	MS	+	0.03	+	0.1	
9	MS	+	0.03	+	1.0	
10	B5	+	0.0	+	0.0	
11	B5	+	0.0	+	0.1	
12	B5	+	0.0	+	1.0	
13	B5	+	0.01	+	0.0	
14	B5	+	0.01	+	0.1	
15	B5	+	0.01	+	1.0	
16	B5	+	0.03	+	0.0	
17	B5	+	0.03	+	0.1	
18	B5	+	0.03	+	1.0	

De los cuales se efectuaron 12 repeticiones para cada una de las 3 variedades de ajo, dando esto un total de 648 unidades experimentales.

La evaluación de las variables se efectuó a ocho semanas de realizado el cultivo *in vitro*; posteriormente se eligieron al azar 6 de las 12 repeticiones de cada una de las variedades de los 18 tratamientos.

Las variables evaluadas fueron: Longitud Inicial de Brote, Longitud Final de Brote, Numero de Hojas, Peso Fresco, Presencia ó Ausencia de Raíz y Presencia o Ausencia de Bulbo.

A las veinte semanas del cultivo *in vitro* se efectuó la toma de datos a las unidades experimentales restantes tomándose en cuenta solo las variables Presencia ó Ausencia de Raíz y Presencia ó Ausencia de Bulbo.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la aplicación del paquete; Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

El método estadístico aplicado en las variables Longitud Inicial de Brote, Longitud Final de Brote, Número de Hojas y Peso Fresco fue el Diseño Factorial de Análisis de Varianza (ANVA) de Fisher (Steel y Torrie 1986), donde los factores son: Medio de Cultivo, Variedades de Ajo (Cadereyta, Celaya y Taiwan) y los Niveles de IAA y Cinetina.

Realizándose, además, una comparación múltiple de medias por el método de Scheffé, para las diferencias significativas encontradas.

Las variables Presencia ó Ausencia de Raíz y Presencia ó Ausencia de Bulbo fueron analizadas mediante las pruebas no paramétricas de X^2 (tablas de contingencia) y correlación de Pearson R.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fase I.- ESTRATIFICACION (período de pre-enfriado)

Los ajos de las tres variedades sometidas a la estratificación durante los meses de Octubre a Diciembre no presentaron cambio aparente. Sin embargo, los que se trabajaron durante los meses de Enero a Mayo presentaban un inicio ligero en la brotación, observándose un crecimiento de hasta 1 mm. de longitud.

Se sabe que los tratamientos de frío dados a los dientes "semilla" adelantan el inicio de bulbificación y acortan los ciclos vegetativos en las plantas originadas por ellos (Ignatiev (1972), Starikova (1976), Ledesma *et al.*, (1980), citados por Ledesma *et al.*, 1983).

Fases II y III.- DESINFESTACION Y BROTACION DEL "DIENTE" DE *Allium sativum* L.

La técnica de desinfestación, así como los tiempos empleados son considerados como los más adecuados para las tres variedades trabajadas. Conci *et al.*, (1986), mencionan que al aumentar la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 5 % por 15 minutos, disminuye la contaminación de un 75 a un 2 % en siete diferentes tipos clonales de ajo. Como puede observarse el resultado obtenido en la presente investigación coincide con lo citado anteriormente ya que al aumentar la concentración del agente desinfestante (20 % v/v NaOCl) con un tiempo de 15 minutos no se presentó contaminación durante la fase de brotación y se mantuvieron los tejidos en óptimas condiciones para su manejo. Por el contrario, Nome *et al.*, citado por Conci *et al.*, (1986), al variar el tiempo de 5 a 40 minutos y manteniendo constante la concentración de NaOCl (5%) observaron una excesiva maceración de los explantes en los tiempos más efectivos.

Se observaron brotes de 0.5 a 1 cm. de longitud en las variedades Cadereyta y Celaya, y brotes de 1 a 2 cm. en la variedad Taiwan; todos los brotes eran de color verde brillante, presentaban además desarrollo de raíces de color crema de 0.5 a 1.5 cm. de longitud en las variedades Cadereyta y Celaya y de 2 cm. en la variedad Taiwan (Fig. 2).



Fig. 2. Brotación de dientes de ajo en agar-agar. Variedad Taiwan: A) Brote y B) Raíces.

Fase IV.- AISLAMIENTO Y SIEMBRA DE LOS BROTES DE *Allium sativum* L. *in vitro*.

A partir de la primera semana de la siembra de los inóculos en los medios de cultivo, se observó crecimiento notable de hojas enrolladas color verde brillante de 3 a 8 mm de longitud en las variedades Cadereyta y Celaya, y hasta de 1.5 cm. de longitud en la variedad Taiwan en diversas unidades experimentales de la mayoría de los tratamientos. Esto difiere con lo mencionado por Osuna (1991), quien destaca que en términos generales las monocotiledóneas han mostrado mayor dificultad para su desarrollo *in vitro* que las dicotiledóneas, y que los avances importantes se han registrado principalmente en cereales, con la obtención de haploides y la inducción de embriogénesis somática.

A ocho semanas del cultivo *in vitro* se observó desarrollo de 1 a 7 hojas en las tres variedades de ajo en los 18 tratamientos.

Hubo formación de callo color café y amarillo pálido en algunas unidades experimentales de la mayoría de los tratamientos. Callos con características parecidas fueron inducidos por Osuna (1991), en 16 tratamientos de MS conteniendo 2,4-D/BAP a partir de explantes de mijo, mediante la técnica de ápice de brote; por Heyser y Nabors (1982), usando varias partes de la planta de mijo proso y por Manzano (1993), en 12 tratamientos de MS conteniendo 2,4-D ó 2,4,5-T con explantes verdes y etiolados de zacate buffel a partir de ápice de brote de plántulas regeneradas asépticamente. Ochoa y García (1990), indujeron callos compactos en todos sus tratamientos con combinaciones de IAA/K (ambos 1-50 μ M) en chile pimiento, y observaron que el crecimiento de los mismos fue promovido por altas concentraciones de IAA e inhibido por el incremento en los niveles de K. Esto coincide con los resultados del presente trabajo ya que en los tratamientos donde no hubo formación de callo el nivel de K fue mayor (0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K y 0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K).

El desarrollo de raíces (Fig. 3) sólo se obtuvo en los tratamientos con 0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K del MS y con 0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K del B5 en la variedad Celaya y en el testigo del medio B5 en la variedad Cadereyta. El inicio de formación de bulbo (Fig.4) se presentó en el tratamiento con 0.1 mg/l de K y sin IAA del MS, en la variedad Celaya, en el de 1.0 mg/l de K y sin IAA del MS en las tres variedades y en el de 0.03 mg/l de IAA y



Fig. 3. Desarrollo de raíces en plántulas de ajo *in vitro* a 8 semanas del cultivo.
 A) Variedad Cadereyta (M.S. con 0.01 mg.l⁻¹ IAA y 1 mg.l⁻¹ de K).
 B) Variedad Celaya (M.S. con 0.03 mg.l⁻¹ IAA y 1 mg.l⁻¹ de K).

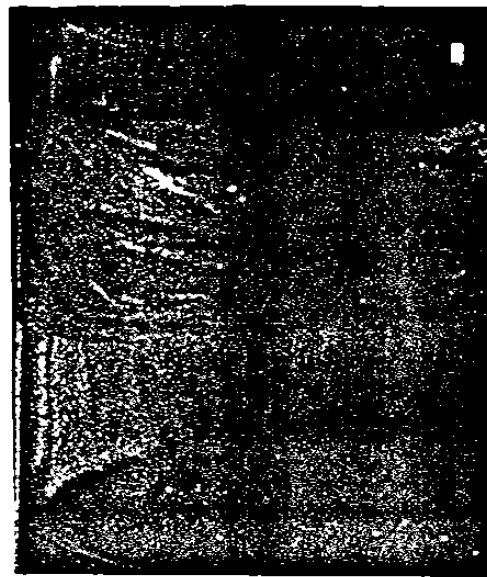
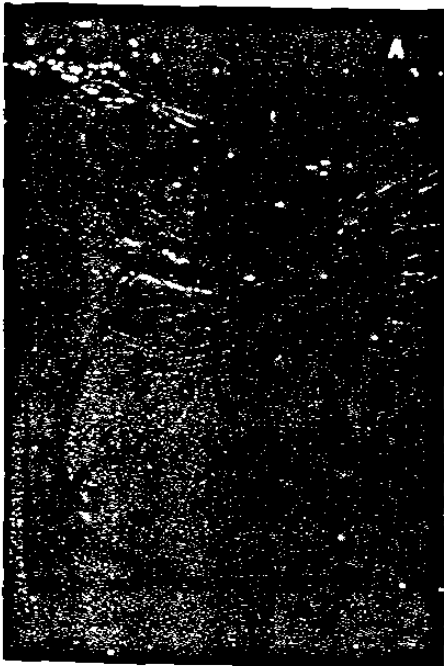


Fig. 4. Inicio de formación de bulbo a 8 semanas del cultivo *in vitro*.
 A) Variedad Cadereyta (1 mg.l⁻¹ de K y sin IAA).
 B) Variedad Taiwan (0.01 mg.l⁻¹ de K y sin IAA).

1.0 mg/l de K del MS en las variedades Cadereyta y Celaya. éstos eran de color verde brillante en Cadereyta y Taiwan y de color lila en la Celaya. El mayor peso fresco (0.1954 g) se obtuvo generalmente en la variedad Taiwan.

En los cuadros 3 al 12 se indican los valores promedio, desviación estandar y coeficiente de correlación de las variables: Longitud Inicial de Brote, Longitud Final de Brote, diferencia entre Longitud Final de Brote menos Longitud Inicial de Brote, Número de Hojas y Peso Fresco, en los cuales se puede observar que existen diferencias entre los tratamientos y las variedades en algunas variables.

Cuadro 3. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Inicial de Brote en cada uno de los 18 Tratamientos.

TRATA- MIENTOS	MEDIA DESV.	ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	3.2857	0.4688	14.26
2	3.3750	0.5000	14.81
3	3.3571	0.6333	18.86
4	3.7222	0.9583	25.74
5	3.5625	0.5123	14.38
6	3.4118	0.6183	18.12
7	3.5333	0.7432	21.03
8	3.3333	0.4851	14.55
9	3.3750	0.7188	21.29
10	3.5833	0.7930	22.13
11	3.5337	0.8872	25.10
12	3.2353	0.4372	13.51
13	3.3333	0.4880	14.64
14	3.5000	0.8549	24.42
15	3.6667	0.9759	26.61
16	3.5000	0.7303	20.86
17	3.3125	0.4787	14.45
18	3.4000	0.5071	14.91
TOTAL	3.4442	0.6674	

Cuadro 4. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Final de Brote en cada uno de los 18 Tratamientos.

TRATA- MIENTOS	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	12.0000	10.0000	83.33
2	24.3750	49.0345	201.16
3	34.9286	48.9513	140.14
4	32.2778	53.2318	164.91
5	5.7500	2.5949	45.12
6	81.8824	80.6659	98.51
7	176.6000	86.7787	49.13
8	23.5000	35.0466	149.13
9	128.9375	132.0023	102.37
10	52.5000	58.3337	111.11
11	31.9286	30.0371	94.07
12	73.5882	70.5993	95.93
13	38.8667	46.5846	119.85
14	28.0000	43.3359	111.88
15	38.7333	43.2244	111.59
16	9.8125	7.8589	80.09
17	131.7500	85.1857	64.65
18	53.3333	44.9868	84.35
Total	54.3333	74.7802	

Cuadro 5. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Diferencia entre Longitud Final menos Longitud Inicial de Brote en cada uno de los 18 Tratamientos.

TRATA- MIENTOS	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	8.7143	9.6749	111.02
2	21.0000	49.0578	233.60
3	31.5714	49.0066	155.22
4	28.5556	52.9875	185.55
5	2.1875	2.4281	110.99
6	78.4706	80.8510	103.03
7	173.0667	86.8870	50.20
8	20.1667	35.1338	174.21
9	125.5625	132.1882	105.27
10	48.9167	58.7343	120.07
11	28.3929	30.3367	106.84
12	70.3529	70.5726	100.31
13	35.5333	46.6091	131.17
14	24.5000	43.1522	176.13
15	35.0667	43.1715	123.11
16	6.3125	7.6917	121.84
17	128.4375	85.1344	66.28
18	49.9333	45.2272	90.57
Total	51.2176	74.8354	

Cuadro 6. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Número de Hojas en cada uno de los 18 Tratamientos.

TRATA- MIENTOS	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	0.7857	0.9750	124.09
2	0.9375	1.3401	142.94
3	1.7857	1.5777	88.35
4	1.1111	1.5297	137.67
5	0.3759	0.6191	165.09
6	2.2353	2.3326	104.35
7	4.6000	1.8822	40.91
8	0.7222	0.8948	123.89
9	3.5000	2.5033	71.52
10	2.4167	2.0207	83.61
11	1.6429	1.9457	118.43
12	3.1765	1.8451	58.08
13	1.8000	1.6987	94.37
14	1.5714	1.6968	107.98
15	2.2667	1.9074	84.14
16	1.0000	1.0954	109.54
17	4.6875	1.8875	40.26
18	3.1333	1.6847	53.76
Total	2.0863	2.0761	

Cuadro 7. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Peso Fresco en cada uno de los 18 Tratamientos.

TRATA- MIENTO	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	0.0708	0.0756	106.77
2	0.1045	0.1214	116.17
3	0.1606	0.1340	83.43
4	0.1191	0.1329	111.58
5	0.0269	0.0207	76.95
6	0.2003	0.2068	103.24
7	0.5022	0.3090	61.52
8	0.0743	0.0892	120.05
9	0.3724	0.3312	88.93
10	0.1049	0.0629	59.96
11	0.0670	0.0410	61.19
12	0.1537	0.0861	56.01
13	0.1210	0.0790	65.28
14	0.0896	0.0776	86.60
15	0.1511	0.0842	55.72
16	0.0517	0.0517	100.00
17	0.2102	0.1263	60.08
18	0.1457	0.0966	66.30
Total	0.1520	0.1810	

Cuadro 8. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Inicial de Brote en cada una de las Variedades de *Allium sativum* L.

VARIEDAD	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	3.0521	0.2234	7.31
2	3.0585	0.2525	8.25
3	4.2841	0.5017	11.71
Total	3.4442	0.6674	

Cuadro 9. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Longitud Final de Brote en cada una de las Variedades de *Allium sativum* L.

VARIEDAD	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	53.1250	77.8291	146.50
2	64.3191	86.0322	133.75
3	46.0227	55.6725	120.96
Total	54.6619	74.7802	

Cuadro 10. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para la Diferencia entre Longitud Final de Brote menos Longitud Inicial de Brote en cada una de las Variedades de *Allium sativum* L.

VARIEDAD	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	50.0729	77.8619	155.49
2	61.2606	86.0196	140.41
3	41.7386	55.6780	133.39
Total	51.21	74.8354	

Cuadro 11. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Número de Hojas en cada una de las Variedades de *Allium sativum* L.

VARIEDAD	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	1.9583	2.1663	110.62
2	2.0957	2.2098	105.44
3	2.2159	1.8286	82.52
Total	2.0863	2.0761	

Cuadro 12. Valores promedio y desviación estandar obtenidos para el Peso Fresco en cada una de las Variedades de *Allium sativum* L.

VARIEDAD	MEDIA	DESV. ESTANDAR	COEF. VARIACION (%)
1	0.1285	0.1863	144.98
2	0.1352	0.1659	122.70
3	0.1954	0.1847	94.52
Total	0.1520	0.1810	

Los resultados obtenidos en el Análisis de Varianza Factorial (ANVA) a ocho semanas del cultivo *in vitro* para las variables consideradas son:

Longitud Inicial de Brote (LIB).- respecto a los tratamientos, se aprecia diferencia significativa para las variedades y su interacción (Cuadro 13); las variedades Cadereyta y Celaya presentaron diferencia significativa con la variedad Taiwan (Fig. 5), al igual que en el ANVA Medio de Cultivo - Variedad (2x3), en ambos factores y su interacción (Cuadro 14), tal como lo reportan Conci *et al.*, (1986), al trabajar el medio de cultivo MS y diversos cultivares de ajo mencionan que las respuestas varían dependiendo del cultivar.

Longitud Final de Brote (LFB).- se muestra diferencia significativa para los tratamientos y su interacción con las variedades (Cuadro 13), así como en la comparación múltiple de medias de Scheffé en el tratamiento: 9 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K de MS) con los tratamientos 5 y 16 (0.01 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K de MS y 0.03 mg/l de IAA y sin K del B5); el tratamiento 17 (0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K del B5) con los tratamientos 5, 1, y 16 (0.01

mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K, testigo del MS y 0.03 mg/l de IAA y sin K del B5); y el tratamiento 7 (0.03 mg/l de IAA y 0.0 mg/l de K de MS) con el resto, excepto con los tratamientos 9 y 17 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K y 0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K de MS y B5 respectivamente (Fig. 6); también se observa diferencia significativa para el Medio de Cultivo, y su interacción con las variedades (Cuadro 14).

Diferencia entre Longitud Final de Brote menos Longitud Inicial de Brote (LFB - LIB).- se presenta diferencia significativa para los tratamientos, y su interacción con las variedades (Cuadro 13), para el medio de cultivo, en la interacción medio de cultivo-variedad (2x3) (Cuadro 14), (Fig. 7). En el análisis factorial (Variedad - Medio de cultivo - Acido Indolacético (IAA) - Cinetina (K) = 3x2x3x3) (Cuadro 15) se observa diferencia significativa con respecto a los niveles de IAA y de K; en las interacciones dobles: Variedad-IAA, Medio de Cultivo-IAA y Medio de Cultivo-K; así como en la interacción triple: Medio de Cultivo-IAA-K y en la interacción total: Variedad-Medio de Cultivo-IAA-K.

De la comparación múltiple de medias de Scheffé se desprende que hay diferencia significativa en el tratamiento: 9 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K de MS) con los tratamientos 5 y 16 (0.01 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K de MS y 0.03 mg/l de IAA y sin K del B5); el tratamiento 17 (0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K del B5) con los tratamientos 5, 1, y 16 (0.01 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K, testigo del MS y 0.03 mg/l de IAA y sin K del B5); y el tratamiento 7 (0.03 mg/l de IAA y 0.0 mg/l de K de MS) con el resto, excepto con los tratamientos 9 y 17 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K y 0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K de MS y B5 respectivamente) (Fig. 8). En éstos tratamientos (7 y 9 de MS) se observa que en el nivel de mayor concentración de IAA hay mayor crecimiento, la mejor respuesta en el medio de cultivo Gamborg, Miller y Ojima (1968), se encontró en el nivel 0.03 mg/l de IAA y el 0.1 mg/l de K (tratamiento 17) esto coincide con lo citado por Murashige (s/a), la auxina es generalmente benéfica para el cultivo de brote apical donde la iniciación de raíz y la elongación de brotes es aumentada, y con lo obtenido por Kartha (1981), en plantas de chícharo en medio B5 en donde la diferenciación de brote y raíz (planta completa) es activada usando 1.0 μ M de NAA como la única hormona aplicada exógenamente.

FIGURA 5. LONGITUD INICIAL DE BROTE (mm.) PARA CADA UNA DE LAS VARIEDADES.

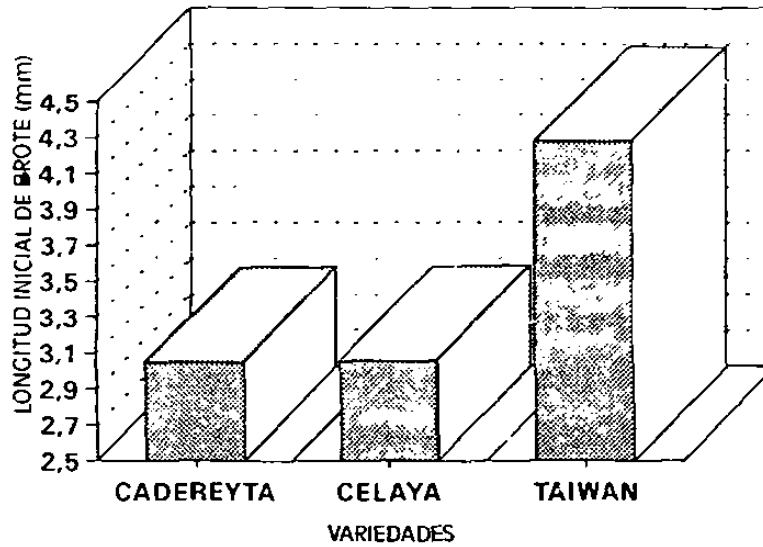
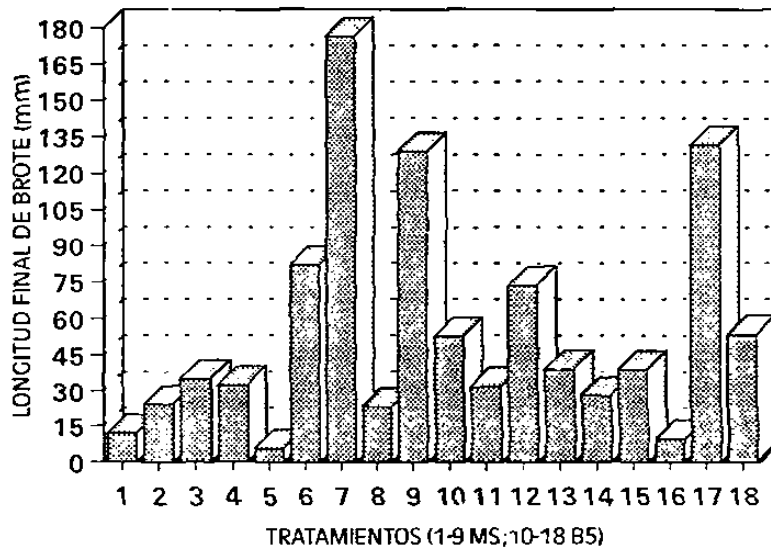


FIGURA 6. LONGITUD FINAL DE BROTE (mm.) PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.



Esto indica que los niveles endógenos de citocininas sintetizados o presentes en el meristemo se aproxima al balance requerido citocinina : auxina (en asociación con la NAA aplicada exógenamente) llevando casi a la regeneración de la planta completa. Cualquier suplemento adicional exógeno de citocinina en el medio de cultivo rompe este balance.

Número de Hojas (NH).- En esta variable se establece diferencia significativa para los tratamientos, y para el medio de cultivo,(Cuadros 13 y 14).

En la comparación múltiple de medias se encontró que los tratamientos 7 y 17 (0.03 mg/l de IAA, sin K del MS y 0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K del B5) difieren significativamente con los tratamientos 5, 8, 1, 2, 4 y 16 (0.01 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K, 0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K, testigo, con 0.1 mg/l de K sin IAA, 0.01 mg/l de IAA sin K del MS y 0.03 mg/l de IAA sin K del B5) para la variable Número de Hojas y el tratamiento 9 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K de MS) con el 1,5, 8, 11 y 16 (testigo, 0.01 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K, 0.03 mg/l de IAA y 0.1 mg/l de K de MS; 0.1 mg/l de K sin IAA y 0.03 mg/l de IAA sin K del B5) para la variable (Fig. 9).

Peso Fresco (PF).- la diferencia significativa en esta variable se muestra para los tratamientos y para el medio de cultivo (Fig. 7); así como para las variedades en ambos análisis de varianza (Cuadros 13 y 14 respectivamente).

En la comparación múltiple de medias los tratamientos 7 (0.03 mg/l de IAA sin K de MS) y 9 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 de MS) difieren significativamente con el resto de los tratamientos (Fig. 10). En lo que respecta a las variedades, Cadereyta y Celaya presentaron diferencia significativa con la variedad Taiwan respecto a la variable (Fig. 11); esto coincide con Rauber y Grunewaldt (1988), quienes mencionan que la habilidad para regeneración de brote esta controlada fuertemente por el genotipo.

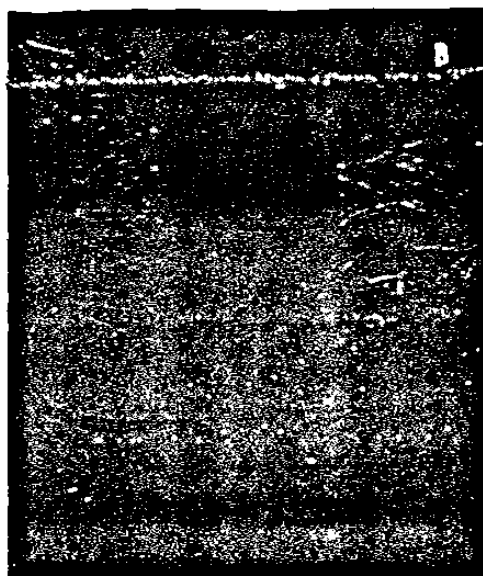


Fig. 7. Máximo crecimiento de brote (LFB-LIB) a 8 semanas del cultivo *in vitro*. A) Variedad Cadereyta en M.S. con 0.03 mg.l^{-1} de IAA y sin K; B) Variedad Celaya en medio B5 con 0.03 mg.l^{-1} de IAA y 0.1 mg.l^{-1} de K).

Cuadro 13 Análisis de varianza, para los tratamientos, las variedades y la interacción de estas, a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

FV	GL	LIB	LFB	LFB- LIB	NH	PF
TRATAMIENTOS	17	.6463	9.4727*	9.4644*	9.0532*	9.9564*
VARIEDADES	2	383.4668*	1.3953	1.5701	0.3532	3.8232*
INTERACCION	19	5.356*	1.631*	1.632*	1.322	1.172
* P<0.05						

LIB=Longitud Inicial del Brote; LFB=Longitud Final del Brote; LFB-LIB=Diferencia entre longitud inicial y longitud final del brote NH=Numero de Hojas y PF=Peso Fresco

Cuadro 14 Análisis de varianza factorial de las variedades estudiadas para los medios de cultivo, las variedades y su interacción, a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

FV	GL	LIB	LFB	LFB-LIB	NH	PF
MEDIO DE CULTIVO	1	4.767*	10.192*	10.192*	9.445*	10.932*
VARIEDADES	2	682.357*	1.470	1.695	0.774	8.056*
INTERACCION	3	5.356*	1.631**	1.632**	1.322	1.172
* P<0.05; ** P<0.01.						

FIGURA 8. DIFERENCIA ENTRE LONGITUD FINAL MENOS LONGITUD INICIAL DE BROTE PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.

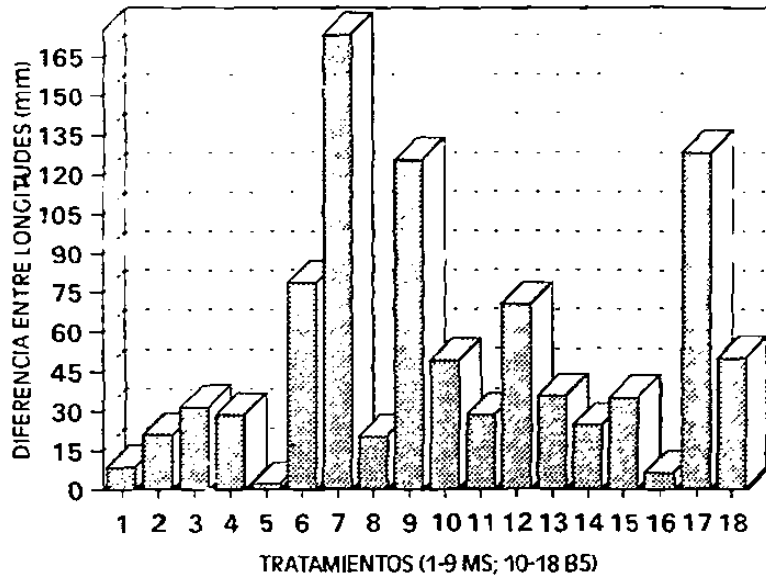
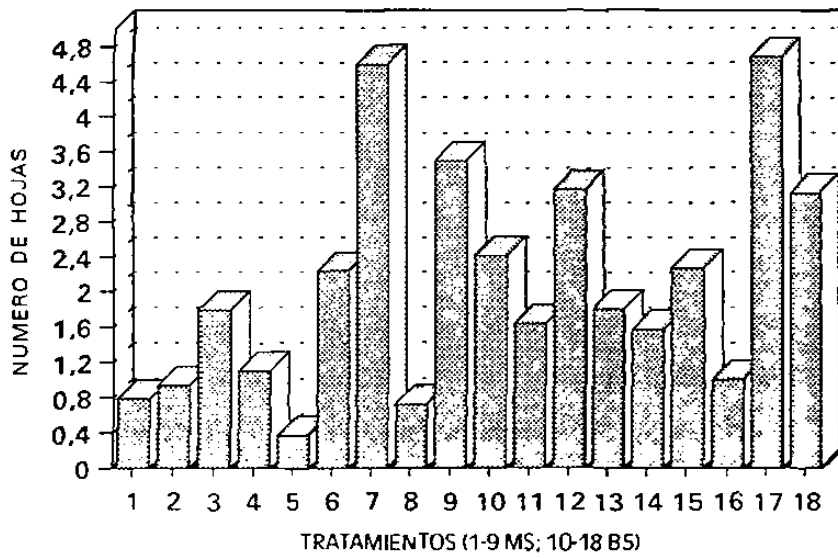


FIGURA 9. NUMERO DE HOJAS PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.



Cuadro 15 Valores de F calculada del Análisis de Varianza Factorial (Variedad-Medio de cultivo-Acido Indolacético (IAA)-Cinetina (K) =3x2x3x3) para la variable Diferencia entre longitud final de brote menos longitud inicial de brote, a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

FV	GL	LFB-LIB
Variedad	2	2.103
Medio de Cultivo	1	0.290
IAA	2	19.377*
K	2	4.700*
Var-Medio de Cultivo	3	0.519
Var-IAA	4	3.376*
Var-K	4	0.784
Medio de Cultivo-IAA	3	9.004*
Medio de Cultivo-K	3	12.096*
IAA-K	4	0.865
Var-Med. Cult.-IAA	5	1.119
Var-Med. Cult.-K	5	1.618
Var-IAA-K	6	1.033
Med. Cult.-IAA-K	5	17.241*
Var-Med. Cult.-IAA-K	7	1.980*

* P<0.05

FIGURA 10. PESO FRESCO (g) PARA CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS

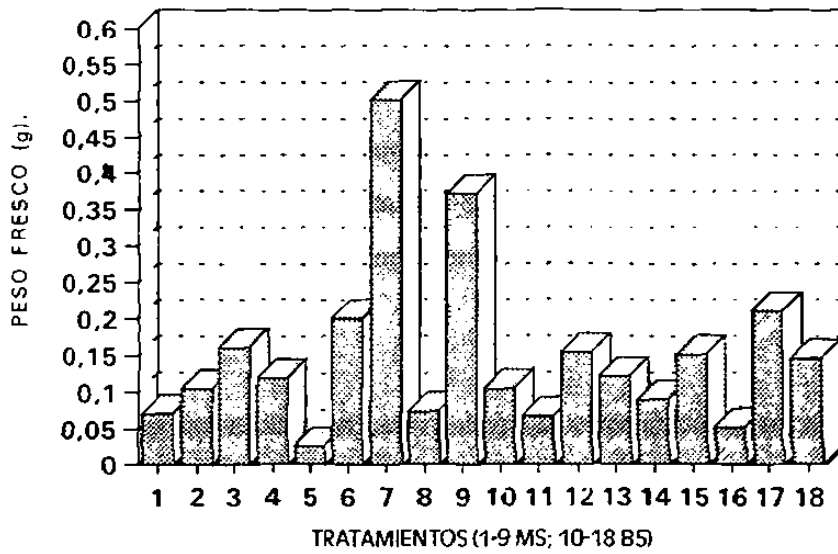
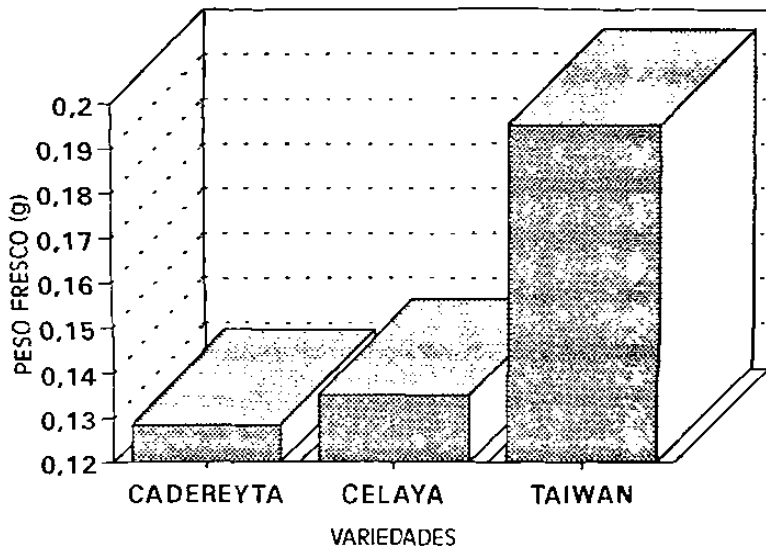


FIGURA 11. PESO FRESCO (g) PARA CADA UNA DE LAS VARIETADES.



Las pruebas no paramétricas: X^2 (Tablas de Contingencia) y Correlación (Pearson R) con significancia ($p < 0.05$) para las variables presencia o ausencia de raíz y para presencia o ausencia de bulbo señalan:

Presencia o Ausencia de Raíz.- con respecto a los tratamientos a ocho y veinte semanas de realizado el cultivo *in vitro* (Cuadros 16,18,20 y 22 respectivamente) muestran que hay Dependencia y Asociación significativas para esta variable; similarmente Bustamante y Muñoz (1993), en cultivo *in vitro* de ajo, mencionan que el porcentaje de explantes con raíces y el número de raíces por explante fueron superiores en medio MS con Cinetina que con BA y el control.

Con respecto a las variedades no se presentó Dependencia ni Asociación significativas (Cuadros 17,19,21 y 23).

Presencia o Ausencia de Bulbo.- la formación de bulbo inició a las ocho semanas del cultivo *in vitro*, en algunas unidades experimentales de las tres variedades en el tratamiento tres (1.0 mg/l de K sin IAA de MS), observándose que a las 11 semanas se encuentra bien definido (Fig. 12), éstos resultados difieren de lo reportado por Barrueto *et al.*, (1994), los cuales mencionan que la formación de bulbo prominente con raíces en su medio de cultivo (1/2 de sales de MS y sin vitaminas) es consecuencia de la acción estimuladora de la sacarosa y del ácido indolbutírico (IBA) a 3.0 mg/l; de Matsubara y Chen (1989), que obtuvieron formación de bulbo a los 60 días después de transferir plántulas (obtenidas *in vitro*) a un medio de cultivo MS conteniendo NAA y BA; y de lo citado por Nagakubo *et al.*, (1993), que indujeron en un período de dos meses bulbillo en medio de cultivo Linsmaier y Skoog (LS) libre de reguladores de crecimiento.

A veinte semanas de realizado el cultivo *in vitro*, las pruebas no paramétricas de X^2 (Tabla de Contingencia) y Correlación (Pearson R) con significancia ($p < 0.05$) muestran una Dependencia y Asociación significativa para la variable con respecto a los tratamientos,(Cuadros 20 y 22), no así para las tres variedades de *A. sativum* L. (Cuadros 21 y 23).

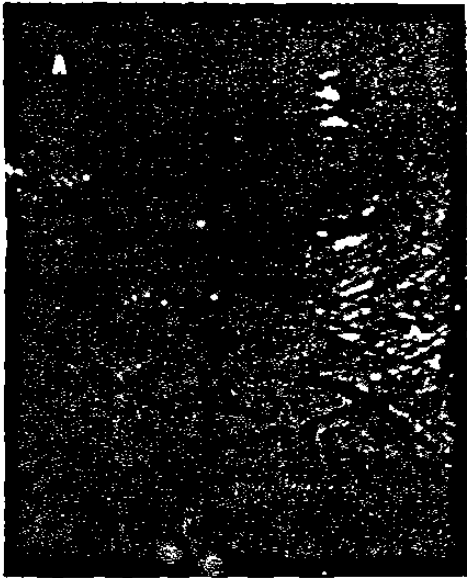


Fig. 12. Bulbo definido a 12 semanas de inicio del cultivo *in vitro* en medio M.S. con 1 mg.l^{-1} de K y sin IAA en las variedades: A) Cadereyta, B) Celaya y C) Taiwan.

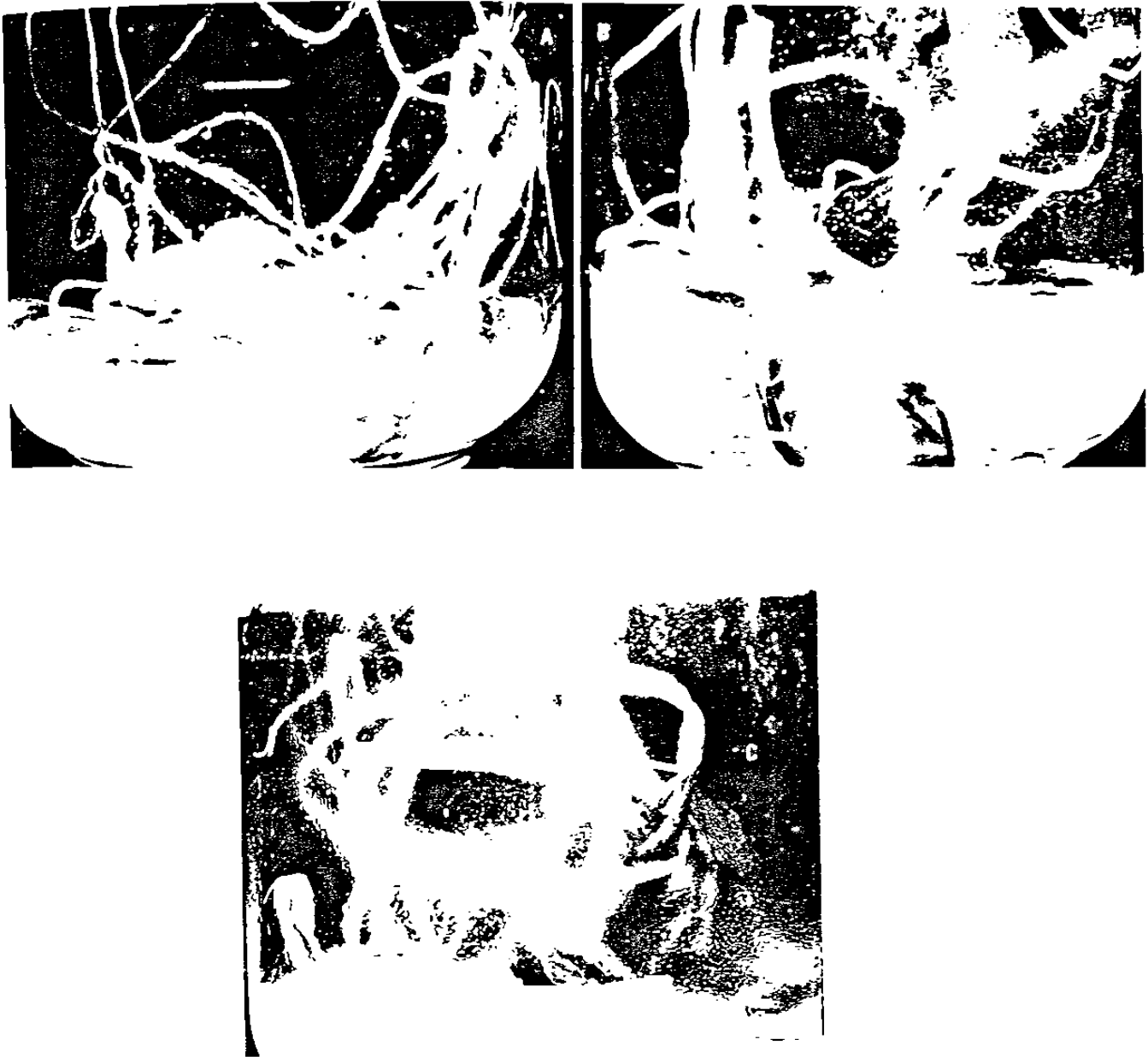


Fig. 13. Formación de doble bulbo a 20 semanas del cultivo *in vitro*.
A) Variedad Cadereyta; B) Variedad Celaya en M.S. con 0.03 mg.l^{-1} de IAA y sin K; C) Variedad Celaya en M.S. con 0.03 mg.l^{-1} de IAA y 1 mg.l^{-1} de K.

Es importante mencionar que, entre las semanas doce y veinte del cultivo *in vitro*, se observó la formación de doble bulbo en dos unidades experimentales del tratamiento 7 (0.03 mg/l de IAA sin K) en las variedades Cadereyta y Celaya, y en una unidad del tratamiento 9 (0.03 mg/l de IAA y 1.0 mg/l de K) de la variedad Celaya (Fig. 13); ambos correspondientes al medio de cultivo Murashige-Skoog (1962), representando 0.62 y 0.31 % respectivamente. no significativo para el total de unidades. El segundo bulbo formado logró en la semana veinte características de tamaño, forma, color y desarrollo de raíces semejantes al primer bulbo. Esto tal vez como consecuencia del uso de hemisulfato de adenina, vitaminas y reguladores del crecimiento, lo cual difiere de Barrueto *et al.*,(1994); Matsubara y Chen (1989), y Nagakubo *et al.*,(1993), que reportan formación de un bulbillo simple.

Cuadro 16 Tabla de valores de X^2 para la presencia de Raíz y Bulbo con respecto a los tratamientos a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

TRATAMIENTOS

VARIABLE	X^2	G.L.	SIGNIFICANCIA
Raíz	31.7232	17	0.016 *
Bulbo	19.52166	17	0.2994

Cuadro 17 Tabla de valores de X^2 para la presencia de Raíz y Bulbo con respecto a las Variedades de *A. sativum* L. a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

VARIEDAD

VARIABLE	X^2	G.L.	SIGNIFICANCIA
Raíz	4.50521	2	0.1051
Bulbo	0.48105	2	0.7862

Cuadro 18 Tabla de valores de la prueba de Pearson R para la presencia de raíz y bulbo con respecto a los tratamientos a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

TRATAMIENTOS		
VARIABLE	R	SIGNIFICANCIA
Raíz	0.12778	0.0168*
Bulbo	- 0.06409	0.1435

Cuadro 19 Tabla de valores de la Prueba de Pearson R. para la presencia de Raíz y Bulbo con respecto a las variedades de *A. sativum* L. a ocho semanas del cultivo *in vitro*.

VARIEDAD		
VARIABLE	R	SIGNIFICANCIA
Raíz	0.00644	0.4575
Bulbo	0.03808	0.2636

Cuadro 20 Tabla de valores de la Prueba de X^2 para la presencia de raíz y bulbo con respecto a los Tratamientos a veinte semanas del cultivo *in vitro*.

TRATAMIENTOS			
VARIABLE	X^2	G. L.	SIGNIFICANCIA
Raíz	60.17663	17	0.0000*
Bulbo	97.38876	17	0.0000*

Cuadro 21 Tabla de valores de la Prueba de X^2 para la presencia de raíz y bulbo con respecto a las variedades de ajo (*A. sativum* L.) a veinte semanas del cultivo *in vitro*.

VARIEDAD			
VARIABLE	X^2	G. L.	SIGNIFICANCIA
Raíz	3.00319	2	0.2228
Bulbo	1.69028	2	0.4295

Cuadro 22 Tabla de valores de la Prueba de Pearson R para la presencia de raíz y bulbo con respecto a los Tratamientos a veinte semanas del cultivo *in vitro*.

TRATAMIENTOS

VARIABLE	R	SIGNIFICANCIA
Raíz	- 0.11679	0.0248*
Bulbo	- 0.31473	0.0000*

4

Cuadro 23 Tabla de valores de la Prueba de Pearson R. para la presencia de raíz y bulbo con respecto a las variedades de *A. sativum* L. a veinte semanas del cultivo *in vitro*.

VARIEDAD

VARIABLE	R	SIGNIFICANCIA
Raíz	- 0.02413	0.3430
Bulbo	0.03777	0.2635

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos y conforme a las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo el presente estudio, se efectúan las siguientes conclusiones:

- La técnica de desinfección que consistió en etanol 70% e hipoclorito de sodio comercial 20% (v/v), durante 15 minutos fue apropiada para lograr el establecimiento aséptico del cultivo *in vitro* en las tres variedades de ajo (*Allium sativum* L.) Cadereyta, Celaya y Taiwan.
- Las combinaciones de reguladores de crecimiento no fueron las adecuadas para promover proliferación de brote.
- El medio de cultivo Murashige-Skoog (1962) promovió mayor peso fresco comparado con el medio de Gamborg, Miller y Ojima (1968).
- Las variedades de "ajo" (Cadereyta, Celaya y Taiwan) mostraron diferencia significativa, encontrando mayor peso fresco en la variedad Taiwan.
- Los mejores resultados se obtuvieron en el medio de cultivo Murashige-Skoog (1962), con el nivel 0.03 mg/l de ácido indolacético (IAA) y los niveles 0.0 y 1.0 mg/l de cinetina (K), correspondientes a los tratamientos 7 y 9.
- La mejor respuesta en el medio de cultivo Gamborg, Miller y Ojima (1968), se encontró en el nivel 0.03 mg/l de IAA y el 0.1 mg/l de K, y corresponde al tratamiento 17.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a las observaciones realizadas durante el transcurso del trabajo se permiten hacer las siguientes recomendaciones:

- Trabajar los "dientes" en forma continua durante los meses de una sola estación, para obtener respuestas más uniformes en el período de estratificación o pre-enfriado.
- Aumentar la concentración de cinetina para favorecer la regeneración y multiplicación de brote.
- Observar por mayor tiempo (más de cinco meses) los cultivos *in vitro* y transferir a nuevos medios de cultivo para seguimiento de su desarrollo.
- Continuar con la fase de aclimatación en condiciones de laboratorio y campo.

LITERATURA CITADA

- Acosta, I.; M. G. Moctezuma.; M. E. Vázquez.; P. C. Ledezma.; M. C. González.; M. Pedraza y M. E. Torre. 1993. *Propiedades y efecto del ajo (Allium sativum L.) sobre el crecimiento de algunas especies de hongos*. Memorias XI Encuentro de Investigación Biomédica. Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado 18 a 22 de Oct. 1993. pag. 49.
- Agrios, G. N. 1988. *Plant Pathology*. Academic Press, Inc. 3a. Ed. pp. 732-735.
- Armstrong, D. G. 1985. *The General Implications of Biotechnology in the Agricultural Industry*. En: L.G. Copping y P. Rodgers (Ed.) *Biotechnology and its application to Agriculture*. BCPC. Cryodon, England. pp. 193-195.
- Barrueto, C. L. P.; R. D. Illg & A. E. Piedrabuena. 1994. *Regeneration of Garlic Plants (Allium sativum L., Cv. "Chonan") Via Cell Culture in Liquid Medium*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:150-155.
- Bovo, O. A., y L. A. Mroginski. 1985. *Obtención de plantas de ajo (Allium sativum L.) por cultivo in vitro de meristemas*. *Phyton* 45(2):159-163.
- Bustamante, M. A. & L. Muñoz. 1993. *In vitro* culture of Garlic in response to Cytokinins and auxin. *In vitro Cellular y Animal*. Vol. 29/A No. 3 Part III Journal of the tissue culture Association.
- Cabrera, L. G. 1980. *Plantas curativas de México*. Editores Mexicanos Unidos. 1a. Edición. pp. 91-93.

- Conci, V. C.; D. N. Moriconi y S. F. Nome. 1986. Cultivo de Meristemos apicales de seis tipos clonales de ajo *Allium sativum* L. *Phyton*. 46(2):187-194.
- Dodds, H. J. & W. R. Lorin. 1986. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. London England. 2a. Ed. pp. 21-31, 46-47.
- Flick, C. E.; D. A. Evans & W. R. Sharp. 1983. *Handbook of Plant Cell Culture*. MacMillan Publ. Co. New York. Vol. 1 p. 13.
- Gamborg, O. L.; R. A. Miller & K. Ojima. 1986. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:148-151.
- García, G. M. 1974. *Manual de Botánica Medicinal*. 2a. Ed. Editores Mexicanos Unidos. pp. 54.
- García, G. A. 1983. Adaptación de 6 cultivares de ajo (*Allium sativum* L.) bajo tres tamaños de dientes y dos densidades en la Región de Marín. N.L. Tesis Ingeniero Agrónomo Fitotecnista. FAUANL. pp. 2-28.
- González, F. M. 1979. *Plantas Medicinales y su uso empírico en los municipios de Mina y Anáhuac, N.L., México*. Tesis Biólogo. FCB. UANL. pp. 85.
- González, S. L. 1979. *Plantas Medicinales y su uso empírico en los municipios de Linares y Dr. Arroyo, N.L., México*. Tesis Biólogo. FCB. UANL. pp. 92.
- Hartman, H. T. y D. E. Kester. 1987. *Propagación de Plantas. Principios y Prácticas*. Ed. C.E.C.S.A. pp. 549-554.

- Heredia, G. E.; Z. A. Heredia y C. L. M. Serrano. 1991. Evaluación de Calidad y Rendimiento de Ocho Selecciones Clonales de Ajo (*Allium sativum* L.). Chapingo Año XV No. 73-74 ENE-JUN.
- Hurtado D. V. y M. E. Merino M. 1988. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. Primera Edición. pp. 232.
- Hussey, G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural an agricultural crops. In Plant Biotechnology. En: S.H. Mantell y H. Smith. Cambridge, London.
- Janick, J. 1965. Horticultura Científica e Industrial. Ed. Acribia. Zaragoza España. pp 155-157.
- Kahane, R. M. R. & T de la S. Bernard. 1992. Long-Term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cycle shoot regeneration in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28:281-288.
- Kartha, K. K. 1981. Meristem culture and cryopreservation Methods and aplicaciones. En: T.A. Thorpe (Ed) *Plant Tissue Culture. Methods and aplicaciones in Agriculture*. Academic Press. Orlando, Florida. pp. 184-193.
- Lassocinski, W.; K. Gorecka & R. Goreki. 1985. Preliminary report on onion *Allium cepa* and garlic *Allium sativum* propagation *in vitro*. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol.* 33:1-6.
- Ledesma A., R. W. Racca y M.I. Rale 1983. Efecto de las condiciones de almacenaje y épocas de plantación sobre el crecimiento en ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo. *Phyton* 43 (2): 207-213.

- López, G. P. 1992. Inducción embriogénesis somática en ajo. (*Allium sativum* L.) XIV Congreso Nacional de Fitogenética. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Escuela de Ciencias Agronómicas Campus V. UACH. pp. 34.
- Lozoya, S. H. 1985. Micropropagación Vegetal. Ciencias y Desarrollo. Nov. Dic. No. 65 año XI. CONACYT. pp. 63-70.
- Luna, A. 1987. Enciclopedia Médica Naturista. Mil Plantas Medicinales. Tomo I. Editores Mexicanos Unidos, S.A. 1a. Ed. pp. 33-34.
- Martínez, M. 1954. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas medicinales. Ed. Botas México. pp. 39.
- Matsubara, S. & D. Chen. 1989. In Vitro Production of Garlic Plants and Field Acclimatization. *Hort Scienc* 24(4):677-679.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473-497.
- Murashige, T. (S/A). *Plant Cell And Organ Culture Methods in the Establishment of Pathogen - Free Stock*. University of California. Riverside, California. pp 1-25.
- Murashige, T. 1974. Principles of Rapid Propagation. Departament of Agriculturae Comunication, Institute of Agriculture. The University of Tennessee. pp. 1-10.
- Murashige, T. 1978. The impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at the University of Calgary. Alberta, Canada. pp. 15-21.

- Murashige, T. 1984. Parameters in regenerating plants *in vitro*. Int. Symposium Plant Tissue and Cell Culture, Application to Crop Improvement. Prague. pp. 2-8.
- Nagakubo, T.; A. Nagasawa; H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic *in vitro* bulblet formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32:175-183.
- Nagasawa, A. & F. Johon. 1988. Induction of Morphogenic Callus Cultures from Leaf Tissue of Garlic. Hort Science 23(6):1068-1070.
- Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of Plant from Tissue Culture. In: Reinert, J. y Y.P.S. Bajaj. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. N.Y.
- Ochoa-Alejo N. y M. A. R. García-Bautista 1990. Morphogenetic Responses *in vitro* of Hypocotyl Tissues of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) to Growth Regulators. Turrialba Vol.40, No.3, 1990, pp. 311-318.
- Osuna, A. P. 1991. Embriogénesis somática y regeneración de plantas *in vitro* en mijo cola de zorra (*Setaria italica* L.) a partir de ápices de brotes. Tesis de maestría en ciencias. DGETA, I.T.A. No. 20, C.I.G.A., Aguascalientes, Ags. 104.
- Phillips, C. G. & J. F. Hubstenberg. 1987. Plant Regeneration *in vitro* of Selected *Allium* Species and Interspecific Hybrids. Hort Science. 22(1):124-125.
- Phillips, G. R. & K. L. Luteyn. 1983. Effects of picloram and other auxins on onion tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 84:250-260.
- Plaper, M. R.; J. Zel & N. Gogala. 1991. Jasmonic Acid an Tissue Culture of Garlic-Monocotyledones. Acta Horticulturae 289, 257-258.

- Quak, F. 1977. Applied and Fundamental Aspects of. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Edited by: J. Reinert and Y. P.S. Bajaj Springer-Verlang. Berlin Heidelberg New York.
- Rauber, M. & J. Grunwaldt. 1988. *In vitro* regeneration in *Allium* spp. Plant. Cell. Rep. 7(6):426-429.
- RIES. 1959. (Reglas Internacionales Para el Ensayo de Semillas). Centro Regional de Ayuda Técnica (RTAC) agencia para el Desarrollo Internacional (AID), Departamento de Estado del Gobierno de los Estados Unidos de América. pp. 27-31.
- Reyes, C. P. 1980. Diseño de Experimentos Aplicados. Ed. Trillas. pp. 219-243.
- Shahin, E. A. & K. Kanenko. 1986. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Callus Cultures of Nonbulbing Onions. Hort Science 21(2):294-295.
- Sociedad Farmacéutica de México. 1970. "Nueva Farmacopa Mexicana" Ed. Botas. México. pp. 45-46.
- SPSS. Statistical Package for the Social Sciences 1975. Second Edition. Nolmen, H. Nie, C. Hadlai Hull, Jean G. Jenicins, Karin Steinbrenner, Dale H. Bent. Mc. Graw-Hill. Book Company. pp. 398-410.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1986. Bioestadística. Principios y Procedimientos. Ed. Mc. Graw-Hill 2da. Ed. pp. 132-142; 177-179.
- Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. En: R.A. Dixon (ed) Plant Cell Culture: a Practical Approach. IRL Press. Oxford, England.

- Van der Valk, P.; O. E. Scholten.; F. Verstappen.; R. C. Jansen, & J. J. M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 30: 181-191.
- Wagemann, M. H. 1991. Cultivo del Ajo. Aspectos Sanitarios. IPA Quilamapu No. 47. pp 8-11.
- Wetter, L. R. & F. Costabel. 1982. *Plant Tissue Culture Methods*. 2a. Ed. National Research Council of Canada (NRCC).pp. 6-9.
- Yasseen, M.; T. L. Davenport; W. E. Splittstoesser & R. M. Skrivin. 1993. Shoot multiplication and bulbo formation from garlic and shallot *in vitro*. *In vitro Cellular y animal*, Vol. 29A No.3 Part. III. Journal of the tissue culture association.
- Yasseen, M.; W. E. Splittstoesser & R. E. Litz. 1994. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:243-247.

**"GRACIAS TE DOY SEÑOR, POR MI EXISTENCIA, POR TODO LO QUE ME
HAS BRINDADO Y POR ESTAR CONMIGO EN TODO MOMENTO".**

