



Autor: MADELEYNE PARRA FUENTES

Facultad: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

Plan de Estudios: INGENIERÍA DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA

Director: ANDRÉS LAIGNELET SIERRA

Titulo de la tesis: DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCION DE SEMILLA PREBASICA INDEXADA DE AJO (*Allium sativum*, L.) VAR. RUBI-1 Y CRIOLLO EN EL LABORATORIO DE MICROPROPAGACION DE PLANTAS DE CORPOICA C.I. TIBAITATÁ DEL MUNICIPIO DE MOSQUERA-CUNDINAMARCA

RESUMEN

Mediante el desarrollo de procesos de innovación tecnológica, se estableció el ciclo productivo “in vitro” de semilla prebásica de ajo Rubí-1 y Criollo libre de *Potyvirus* e indexada mediante la técnica ELISA indirecto. El comportamiento de los genotipos favoreció la unificación del proceso productivo. Esta investigación es punto de partida para la implementación del programa de producción de semillas limpias de alta calidad de ajo en CORPOICA C.I. Tibaitatá.

CARACTERÍSTICAS

PÁGINAS 86 ILUSTRACIONES _____ PLANOS _____ CD-ROM 1

**DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA
PREBÁSICA INDEXADA DE AJO (*Allium sativum*, L.) VAR. RUBÍ-1 Y CRIOLLO
EN EL LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE
CORPOICA C.I. TIBAITATÁ DEL MUNICIPIO DE MOSQUERA-
CUNDINAMARCA**

MADELEYNE PARRA FUENTES

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA
2006**

**DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA
PREBÁSICA INDEXADA DE AJO (*Allium Sativum*, L.) VAR. RUBÍ-1 Y CRIOLLO
EN EL LABORATORIO DE MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE
CORPOICA C.I. TIBAITATÁ DEL MUNICIPIO DE MOSQUERA-
CUNDINAMARCA**

MADELEYNE PARRA FUENTES

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero de Producción Biotecnológico**

**Director
ANDRÉS LAIGNELET SIERRA
Biólogo**

**Codirector
HERNÁN PINZÓN RAMÍREZ
Ingeniero Agrónomo M. Sc.**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA
SAN JOSE DE CUCUTA
2006**



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
Ingeniería de Producción Biotecnológica

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 10 DE OCTUBRE DE 2006

HORA: 04:00 P.M.

LUGAR: SALA 3 EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA DE PRODUCCION BIOTECNOLOGICA

TITULO DE LA TESIS: "Desarrollo de tecnologías para la producción de semilla prebásica indexada de ajo (*Allium Sativum* L.) Var Rubí - 1 y criollo en el laboratorio de micropropagación de plantas de Corpoica C.I. Tibaitatá del Municipio de Mosquera -Cundinamarca".

JURADOS: Msc. LILIAN DUPLAT BERMUDEZ
Ing. CLAUDIA Y. GARCIA ROJAS
Msc. YANETH A. MUÑOZ PEÑALOZA

DIRECTOR: ANDRES LAIGNELETH SIERRA
CODIRECTOR: HERNAN PINZON RAMIREZ

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
MADELEYNE PARRA FUENTES	610131	4.80

OBSERVACIONES:
MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

A mis queridos PADRES, Galo Uriel y Rosalía, quien son un ejemplo de vida, valor, amor y entrega. Porque todas sus energías y esfuerzos siempre han sido para hacer de sus hijos personas de bien y con grandes metas. Porque me enseñaron a superar las adversidades y a confiar en Dios. Porque sin ellos no habría alcanzado este logro.

A mis Hermanos, Katy, Uriel y Edwin, con quienes he vivido diferentes momentos que me han brindado enseñanzas de vida.

A mi Querido Sobrino Juan Sebastián, mi cielito lindo, mi alegría, mi ánimo, la personita que me devuelve la paz en los tiempos difíciles.

Dios Padre: “¿Cómo te pagaré tanto bien que me has hecho?”

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Andrés Laignelet Sierra, Coordinador del Programa Gestión e Innovación Tecnológica de CORPOICA, a quien admiro y aprecio por ser un gran profesional, por su orientación certera y oportuna durante la realización de esta investigación.

Al Ingeniero Hernán Pinzón Ramírez, por la confianza y credibilidad depositada en mí para la ejecución de este proyecto.

A las investigadoras Lilian Duplat y Rocío Margarita Gámez, por todo el apoyo personal y profesional brindado. Por ser originales.

A los investigadores Guillermo Carvajal y Jorge Arguelles por la asesoría estadística brindada.

Al Programa Gestión e Innovación Tecnológica de CORPOICA, a sus investigadores, a Patricia López y a todo el personal del laboratorio de Micropropagación de Plantas, especialmente a Rodrigo González y a Yolanda Torres, quienes me brindaron sus conocimientos técnicos de manera eficaz y atenta.

A ti que tuviste la palabra, la actitud y la acción indicada para motivarme y me brindaste los medios para hacer tangible esta experiencia.

A Andrey, Yajaira, Astrid, Ruth, Mónica, Amanda, Soledad y a todos los que me ayudaron directa e indirectamente y me dieron su aporte para mi desarrollo y crecimiento tanto personal como profesional.

A CORPOICA, por impulsar la investigación científica.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	15
1. MATERIALES Y METODOS	20
1.1 MATERIAL VEGETAL	20
1.1.1 Selección del material vegetal.	20
1.1.2 Condiciones ambientales de desarrollo del material vegetal.	20
1.2 METODOS	20
1.3 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN	30
2. ANALISIS DE RESULTADOS	31
2.1 FASE I: ETAPA PREPARATIVA	31
2.2 FASE II: ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	37
2.3 FASE II: ETAPA DE MULTIPLICACIÓN	46
2.3.1 Ecuación general de producción.	54
2.4 FASE III: ETAPA DE MICROBULBIFICACIÓN	55

2.5 FASE IV: INDEXACIÓN FITOSANITARIA DE LAS PLÁNTULAS ESTABLECIDAS A Potyvirus MEDIANTE ELISA	58
2.6 COSTOS PARA LA PRODUCCION DE PLANTULAS “in vitro” DE AJO RUBÍ-1 Y CRIOLLO INDEXADAS A Potyvirus	60
2.6.1 Costos de los insumos requeridos en cada etapa de producción.	60
3. CONCLUSIONES	63
4. RECOMENDACIONES	65
BIBLIOGRAFIA	66
ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estructuración de las fases y etapas de la investigación	21
Tabla 2. Desinfección de riesgo	22
Tabla 3. Tratamientos de desinfección evaluados	22
Tabla 4. Tratamientos evaluados en la etapa de iniciación o establecimiento	24
Tabla 5. Tratamientos del primer ensayo de la etapa de Multiplicación	25
Tabla 6. Tratamientos del segundo ensayo de la etapa de Multiplicación	26
Tabla 7. Tratamientos evaluados en la etapa de Microbulbificación	28
Tabla 8. Muestras de ajo Rubí-1 y Criollo analizadas con la técnica ELISA indirecto para Potyvirus	29
Tabla 9. Evaluación de bulbillos de ajo Rubí-1 y criollo	31
Tabla 10. Comparación de las medias presentadas en las siembras por las variables Hongos, Bacterias y Contaminación Total en la Fase I según la prueba de Tukey	32
Tabla 11. Comparación de las medias presentadas en los tratamientos por las variables Hongos, Bacterias y Contaminación Total en la Fase I según la prueba de Tukey	32
Tabla 12. Comparación de las medias presentadas en las siembras y tratamientos por la variable Viabilidad de la Fase I según la prueba de Tukey	34
Tabla 13. Comparación de las medias presentadas en las siembras y tratamientos por la variable Vitrificación de la Fase I según la prueba de Tukey	36
Tabla 14. Variables evaluadas en la etapa de establecimiento en ajo Criollo	38
Tabla 15. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey para la altura de las plántulas en las siembras de la etapa de establecimiento	39
Tabla 16. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey para el número de hojas de las plántulas en las siembras de la etapa de establecimiento	42

Tabla 17. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey para el número de raíces de las plántulas en las siembras de la etapa de establecimiento	43
Tabla 18. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de hojas y el número de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en la etapa de establecimiento	45
Tabla 19. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el primer subcultivo del primer ensayo de multiplicación de ajo Criollo	47
Tabla 20. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo subcultivo del primer ensayo de multiplicación de ajo Criollo	48
Tabla 21. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo ensayo de multiplicación de ajo Criollo	49
Tabla 22. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por la interacción “Tratamiento 2ip Moriconi * Tratamiento de Introducción” para la altura, el número de brotes/explante, hojas y raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo ensayo de multiplicación de ajo Criollo	50
Tabla 23. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por la interacción “Tratamiento 2ip FAO * Tratamiento de Introducción” para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo ensayo de multiplicación de ajo Criollo	51
Tabla 24. Coeficiente de multiplicación presentado en cada subcultivo en las siembras realizadas de ajo Criollo y Rubí-1	52
Tabla 25. Comparación del coeficiente de multiplicación promedio presentado en cada subcultivo según la prueba de Tukey por las variedades Rubí-1 y Criollo	53
Tabla 26. Comportamiento de las variables en la etapa de microbulbificación de ajo criollo	56
Tabla 27. Evaluación fitosanitaria a Potyvirus en diferentes muestras de ajo Rubí-1 y criollo	59
Tabla 28. Ensayos ELISA’s para Potyvirus en ajo Criollo y Rubí-1	60

Tabla 29. Costos de los insumos en las etapas de producción “in vitro” de ajo Rubí-1 y Criollo indexadas a Potyvirus 61

Tabla 30. Costos de los insumos de la semilla “in vitro” de las variedades de ajo Rubí-1 y Criollo indexadas a Potyvirus 62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Material vegetal seleccionado de ajo Rubí-1 y de ajo criollo	21
Figura 2. Desinfección de riesgo	22
Figura 3. Proceso de extracción aséptica del meristemo de ajo	23
Figura 4. Plántulas de ajo en etapa de establecimiento	25
Figura 5. Desarrollo de plántulas de ajo en etapa de multiplicación	27
Figura 6. Desarrollo de plántulas de ajo en la etapa de microbulbificación	28
Figura 7. Esquema protocolo ELISA Indirecto Agdia®	29
Figura 8. Ensayos ELISA's para Potyvirus en ajo Criollo y Rubí-1	58

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Comparación del comportamiento de las variables Viabilidad y Vitrificación en la Fase I	37
Gráfico 2. Comportamiento de la altura de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina” en la etapa de establecimiento	40
Gráfico 3. Comportamiento de la altura de las plántulas ante las interacciones “Auxina* Nivel de Kinetina” en la etapa de establecimiento	41
Gráfico 4. Comportamiento del número de hojas de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina” en la etapa de establecimiento	42
Gráfico 5. Comportamiento del número de hojas de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Kinetina” en la etapa de establecimiento	43
Gráfico 6. Comportamiento del número de raíces de las plántulas de ajo Criollo en la etapa de establecimiento	44
Gráfico 7. Coeficiente de multiplicación presentado en cada subcultivo en las siembras realizadas de ajo Criollo y Rubí-1	53

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Formulación del medio basal para el cultivo “in vitro” de ajo	72
Anexo B. Evaluación de bulbos y bulbillos de ajo Criollo y Rubí-1	73
Anexo C. Resultados de los análisis estadísticos de las etapas del proceso	74
Anexo D. Esquema de la micropapagación de ajo Rubí-1 y Criollo	86

INTRODUCCIÓN

El Ajo (*Allium sativum* L) tiene su origen en el continente asiático y es apetecido esencialmente por ser un buen condimento que tiene sustancias nutritivas como calcio, azúcares, proteínas, sólidos, hierro y vitamina. Adicionalmente, la alicina y los diferentes sulfatos presentes en sus compuestos lo hacen, cada vez, más llamativo como producto medicinal. El Ajo es comercializado para sus diversos usos en polvo, deshidratado, en comprimidos, procesado, en aceite y fresco. Debido a las propiedades que posee el ajo como condimento y terapéutico las industrias procesadoras de alimentos y las industrias farmacéuticas demandan el suministro de materia prima para la elaboración de los diferentes productos manufacturados por estas. Además, el uso tradicional del ajo como condimento básico de la cocina familiar exige una oferta constante del mismo en el mercado.

El cultivo de ajo ocupa actualmente, un renglón importante en la economía agrícola de países como China, India y Corea, exportadores mundiales que abastecen más del 81.27% del producto requerido por los países pequeños y medianos productores (FAOSTAT, 2006). Los incrementos presentados a nivel mundial durante los últimos 10 años en la tendencia de producción, el área cultivada y el rendimiento de producción reflejan la importancia que ha tomado el cultivo del ajo y la necesidad de utilizar tecnologías modernas, sostenibles y rentables para la producción de ajo de calidad agronómica pero, sobretudo con calidad fitosanitaria. Es conocido mundialmente que los problemas sanitarios presentes en la semilla comercial de ajo se deben a los complejos virales Potyvirus, Carlavirus y Allexivirus, causantes de grandes pérdidas económicas en los cultivos implementados. Adicionalmente, las pérdidas presentadas por el ataque de bacterias, hongos y nemátodos son altamente significativas (Conci, 2002).

La tendencia presentada en la producción nacional de Ajo entre 1997 y 2001 fue de descenso gradual, pasando de producir 3.677 toneladas a 1.690 toneladas, incrementándose, consecuentemente, la importación en este mismo período de 10.022 a 21.073 toneladas. La producción nacional de ajo es liderada por el departamento de Santander con un 47%, seguido por Boyacá, Cundinamarca, Norte de Santander y Tolima con 19%, 18%, 11% y 2%, respectivamente (SIPSA, 2003). En estas regiones la producción se basa en genotipos foráneos heterogéneos en tamaño, color y forma, además de poco adaptados a las condiciones ambientales existentes en las regiones cultivadoras, el desarrollo de cultivos con semillas obtenidas por mezcla de genotipos sin caracterizar agroeconómicamente y el uso de semilla portadora de fitopatógenos.

La no disponibilidad de semilla de Ajo de buena calidad agronómica y sanitaria, la inexistencia de productores de semillas certificadas, la falta de una legislación vigente al respecto y un sistema de selección de semilla basado en la demanda del mercado (mayor demanda menor reserva de semilla), generan consecuencias en la calidad y cantidad de semilla disponible para los agricultores, conduciendo a la generación de pérdidas económicas debido a los altos costos de producción y bajos rendimientos haciendo que el agricultor pierda, cada vez más, interés en este cultivo.

CORPOICA en su búsqueda de soluciones efectivas para el sector agrícola, basadas en el desarrollo de procesos de innovación tecnológicos, ha obtenido la primera variedad nacional mejorada de Ajo denominada Rubí-1, caracterizada por su buen sabor o pungencia, olor, tamaño, y facilidad de pelado del diente (Pinzón, 1999), sumado a otras características de interés agroeconómicas como tolerancia al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* y un rendimiento superior al 30% en la producción frente a otras variedades comerciales.

Estas características atractivas a nivel agroeconómico del ajo Rubí-1 son útiles para el aprovechamiento de esta variedad como donadora del material vegetal para el programa de producción de semilla certificada a fitopatógenos debido a que mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos para la producción de semillas limpias de alta calidad, posibilita dar solución a la problemática sanitaria y agroeconómica existente alrededor del cultivo de ajo. Así mismo, la utilización de estas técnicas en genotipos criollos con buenas características agrícolas permitirán disponer de diferentes materiales genéticos de buena calidad y sanidad incentivando este cultivo.

A través del uso del cultivo de tejidos vegetales es posible el saneamiento fitosanitario de especies de interés socioeconómico, como el Ajo, que presentan una producción pobre de propágulos o una propagación vegetativa insuficiente (JIMÉNEZ (1998) y ORELLANA (1998), citado por el INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HORTÍCOLAS “LILIANA DIMITROVA” - IIH, 2001), permitiendo el establecimiento de un mayor número de cultivos libres de fitopatógenos.

La primera fase del proyecto aprobado por Colciencias que busca el establecimiento de un modelo biotecnológico de producción de semillas limpias certificadas de ajo a partir de variedades de interés agroeconómico que favorezcan el fomento, implementación y adecuación de este cultivo, ha precisado la implementación de procesos que permitan el saneamiento de la semilla garantizando la producción de plantas libres de fitopatógenos y una recuperación gradual de los cultivos a medida que se suministra semilla de calidad a los agricultores. La disponibilidad de semilla sana de Ajo de buenas características agronómicas y de calidad, proporcionada oportunamente al agricultor, puede incentivar la implementación de nuevos cultivos, así como el mejoramiento de los ya existentes,

llegando a recuperarse el mercado nacional y posibilitando la intervención en el mercado externo a largo plazo.

Mediante el desarrollo y la implementación de procesos de innovación tecnológica para la producción de semillas limpias de alta calidad de ajo, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) C.I. Tibaitatá busca, al proporcionar semilla libre de fitopatógenos, un aumento gradual en la producción que permita recuperar el mercado nacional e incrementar la rentabilidad y productividad de los cultivos al brindarle al agricultor un producto con las características deseadas.

El objetivo general de la presente investigación buscó el desarrollo de un modelo para la producción “in vitro” a partir de tejido meristemático de semilla limpia de Ajo Rubí-1 y de una variedad de ajo Criollo seleccionada por las buenas características de producción en el cultivo diagnosticada mediante la técnica ELISA indirecto como libre de Potyvirus.

Los objetivos específicos permitieron establecer el protocolo eficiente para la desinfección microbiana del material vegetal donante, así como determinar las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento para las etapas de establecimiento y multiplicación, y la concentración adecuada de sacarosa que favoreciera el proceso de microbulbificación. Se consideró entre los objetivos específicos determinar el coeficiente de multiplicación, el ciclo del cultivo y el análisis económico “in vitro” del proceso de microbulbificación de Ajo. Y finalmente, diagnosticar la calidad sanitaria del material establecido a *Potyvirus* mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

La investigación bibliográfica abarcó los inicios de la técnica de cultivo de tejidos con el planteamiento de la ley de la totipotencia por Haberland¹, los primeros trabajos de saneamiento por cultivo “in vitro” para obtener plantas libres de patógenos por Limusset y Cornuet con tabaco en 1949, y Morel y Martín con dalia en 1952². Así mismo, los adelantos investigativos con ajo utilizando la técnica del cultivo de tejido como método para sanear semilla infectada con virus en 1971 por Morr y la investigación de Wang y Huang en 1974 quienes obtuvieron las primeras plántulas de ajo libres del agente viral³. Los manuales de la FAO para América Latina y el Caribe de 1989 y 1991 brindaron indicaciones útiles para el desarrollo exitoso de esta investigación. Mientras que trabajos

¹ PEREZ PONCE, J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. p. 19.

² MARTÍNEZ R., Paulina. Obtención de plantas libres de patógenos mediante el cultivo de tejido meristemático y termoterapia. Bogotá: Produmedios. 1987. En: ICA 22(4): 230-248.

³ WALKEY, D. G. Production of virus-free Garlic (*Allium sativum* L.) and Shallot (*Allium*) by meristem tip culture. Wellesbourne: National Vegetable Research Station, 1987. En: Journal of horticultural Science 62(2): 211-220

como los de Mújica y Mogollón (2004), Conci (2002 y 2004), Quezada (2001), Alvarado (2001) dieron soporte y respaldo a los resultados obtenidos.

La investigación se enmarcó dentro de conceptos fundamentales como:

Ajo Rubí-1. Es la primera variedad colombiana de ajo obtenida por CORPOICA a través de un proceso investigativo de caracterización, evaluación y selección a partir de 10 clones promisorios, 5 de origen argentino y 5 pertenecientes al banco de germoplasma del ICA. El clon argentino A014 fue la base de la variedad de ajo Rubí-1⁴.

Cultivo de meristemos. El meristemo es una pequeña masa de células indiferenciadas situadas en la parte terminal del tallo, ápices o yemas; ofrece la posibilidad de eliminar patógenos vasculares y sistémicos como los virus, tiroides y micoplasmas de gran número de especies propagadas vegetativamente⁵, debido a la gran actividad y la falta de elementos vasculares en el meristemo que dificulta la llegada de partículas víricas. Debido a las ventajas de esta técnica es posible utilizar plantas de ajo enfermas con virus como donantes del material de partida en el proceso de micropropagación y lograr porcentajes satisfactorios de saneamiento.

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Es una técnica serológica de análisis diagnóstico que permite detectar la presencia o ausencia de los patógenos vasculares en el tejido vegetal analizado. Este método altamente sensible y de gran especificidad permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones de manera sencilla y económica. Presenta además buena reproducibilidad y facilidad de interpretación de los resultados. Es una técnica fácil, rápida y de bajo costo.

Microbulbificación. La alta concentración de sacarosa aumenta el potencial osmótico de las plántulas de Ajo generando estrés hídrico e induciendo la formación de estructuras de reserva o microbulbillos en las plántulas “in vitro”.

Microbulbillos. Los microbulbillos de Ajo obtenidos exclusivamente mediante cultivo “in vitro” y liberado de la presencia de fitopatógenos son las estructuras que luego de su secado y curado adecuado originarán en invernadero minibulbillos que permitirán la obtención de plantas y bulbos normales. La obtención de plántulas con el desarrollo de microbulbillos

⁴ PINZON RAMIREZ, Hernán. Rubí-1: primera variedad mejorada de Ajo en Colombia. Bogotá: Produmedios, 1999. p. 7.

⁵ MONTOYA HENAO, Luz Marina. Cultivo de tejidos vegetales. Medellín: Ealón, 1991. p. 100.

permite una mejor aclimatización de las mismas durante la etapa de endurecimiento y ahorrarán tiempo ya que no se hace necesario el secado y curado de las mismas.

Potyvirus. Pertenece al grupo de virus formado por partículas de morfología flexible y filamentosa de un tamaño aproximado de 800nm de largo. Se caracteriza porque se transmite de forma eficiente por áfidos vectores diseminándose fácilmente y rápidamente dentro del cultivo.

Semilla prebásica. Dentro del proceso de producción de semilla básica inicial de Ajo establecido por los países que han normatizado la producción del cultivo de Ajo se considera semilla prebásica es a la microplanta o el microbulbillo proveniente de cultivo “in vitro” sin ninguna multiplicación “in vivo” y que se encuentra libre de fitopatógenos. En el caso del ajo pueden ser plantas obtenidas a partir del crecimiento del bulbo inducido “in vitro” (microbulbillos) que al mismo tiempo facilitan el intercambio genético de material y la conservación de bancos de germoplasma⁶.

Las fases investigativas del proceso productivo de semilla prebásica de ajo Rubí-1 y Criollo se desarrollaron a escala de laboratorio y abarcaron las etapas propuestas por la FAO (1991) para el proceso de micropropagación de Ajo.

⁶ QUEZADA, J. A., ASCARRUNZ, M. E. y SILVA, M. A. Evaluación de la respuesta de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) a la variación de medios y reguladores de crecimiento, en el proceso de microbulbificación in Vitro. La Paz, 2001 [citado en mayo de 2005]. Disponible en internet: <URL:http://redbio.org/portal/encuentro/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-030/htm>

1. MATERIALES Y METODOS

1.1 MATERIAL VEGETAL

En la ejecución de este proyecto se utilizaron bulbos o “cabezas” de ajo de las poblaciones de ajo var. Rubí-1 y de ajo Criollo provenientes de un lote cultivado en el segundo semestre del año 2004 en CORPOICA C.I. Tibaitatá de cada una de las variedades y cosechados a finales del segundo semestre de 2004, los cuales se almacenaron en una bodega protegidos de la humedad y de la presencia de fitopatógenos.

Los bulbos se desgranaron para seleccionar los bulbillos o “dientes” que se utilizaron en el presente trabajo como donantes del ápice meristemático a establecer “in vitro”, para realizar el análisis inmunoenzimático a Potyvirus y como semilla en el montaje de un pequeño cultivo para obtener las muestras foliares para análisis inmunoenzimático a Potyvirus.

1.1.1 Selección del material vegetal. Se seleccionaron los bulbillos de los genotipos de estudio que presentaban un desarrollo del índice visual de superación de dormición (IVD) superior al 50% y que no mostraban lesiones o agresiones físicas, ni señales de ataque por plagas o enfermedades fúngicas o bacterianas y con un tamaño \geq a 2.5cm.

1.1.2 Condiciones ambientales de desarrollo del material vegetal.. El proceso de cultivo “in vitro” se llevó a cabo en las siguientes condiciones de crecimiento y desarrollo: fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, y temperatura de 20 +/- 2°C, con temperatura mínima de 16°C y máxima de 25°C.

1.2 METODOS

El proceso productivo de semilla prebásica de ajo a través de la micropropagación incluye 4 etapas, donde el análisis de cada una de ellas requiere de un diseño estadístico o de una metodología de evaluación que se ajuste a los objetivos propuestos en las diferentes fases de la investigación. Las fases se desarrollaron a escala de laboratorio y abarcan las etapas propuestas por la FAO (1991) para el proceso de micropropagación de Ajo. Se estructuraron como se muestran en la Tabla 1:

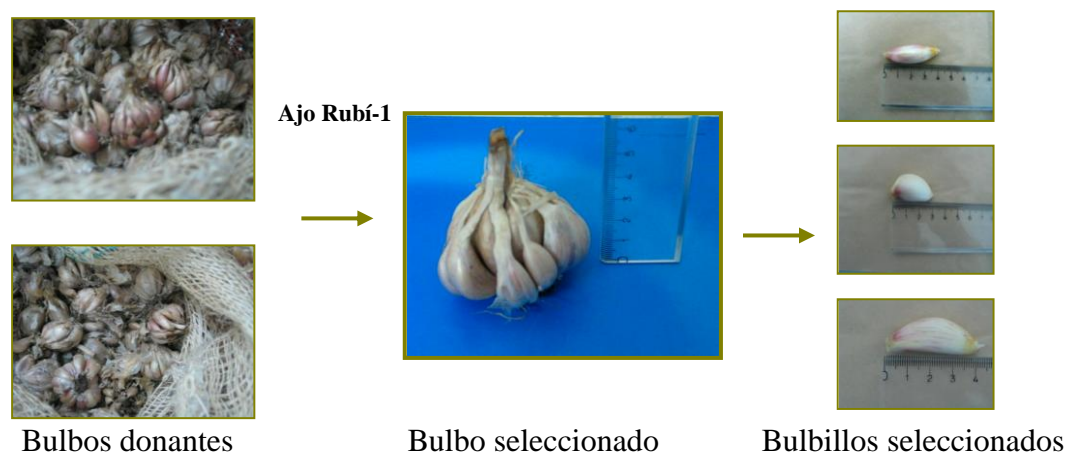
Tabla 1. Estructuración de las fases y etapas de la investigación

Fases	Etapas
Fase I	Etapa 0: preparativa
Fase II	Etapa 1: introducción Etapa 2: multiplicación
Fase III	Etapa 3: microbulbificación
Fase IV	Etapa 4: análisis ELISA

- **Fase I: Preparativa: Etapa 0.** Selección del material vegetal y determinación del tratamiento adecuado en la desinfección de microorganismos bacterianos y fúngicos.

Selección del material vegetal. Se seleccionaron 25 bulbos sin desgranar con un período de almacenamiento superior a 3 y ½ meses. Los bulbos se desgranaron para escoger los bulbillos aptos para el proceso de propagación “in vitro” según las características de selección de material vegetal establecidas. Los bulbillos se midieron, seleccionándose aquellos con un tamaño superior a 2.5cm, los cuales se pesaron para establecer el peso promedio por bulbillo (Véase Figura 1).

Figura 1. Material vegetal seleccionado de ajo Rubí-1 y de ajo criollo



Posteriormente, se almacenaron en un contenedor marcado con el número correspondiente a la cabeza evaluada. Dos bulbillos se escogieron guardaron para analizarlos mediante la

técnica ELISA indirecto a *Potyvirus*, los demás se utilizaron para determinar el procedimiento de desinfección adecuado.

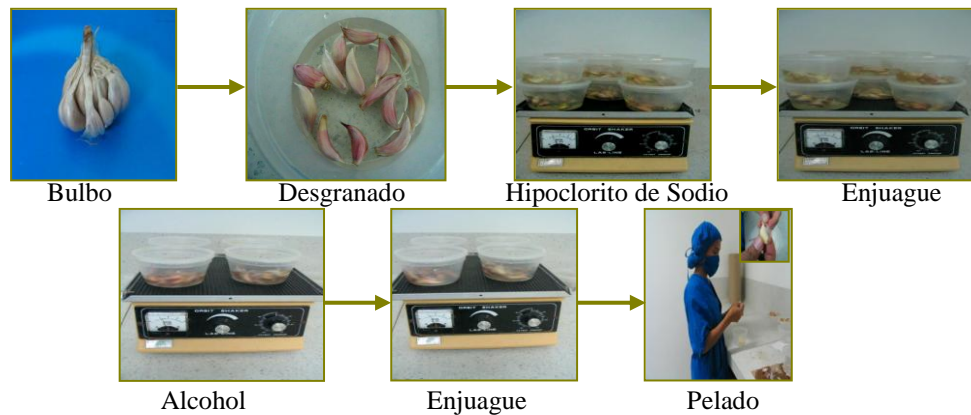
Determinación del tratamiento adecuado para la desinfección de microorganismos bacterianos y fúngicos. El procedimiento de desinfección incluyó dos ciclos: la desinfección de riesgo y la desinfección preparativa. La desinfección de riesgo (Véase Tabla 2) se aplicó a todos los bulbillos de ajo desgranados pero sin eliminarles la membrana de protección con el fin de disminuir la carga microbiana presente en la superficie de las membranas externas y que al realizar el pelado de los bulbillos no haya una transferencia de microorganismos a la hoja de almacenamiento (Véase Figura 2).

Tabla 2. Desinfección de riesgo

Parámetros	Condiciones	Tiempo
Remojo	Agua estéril D	5min
Hipoclorito de Sodio	3%	5min
Enjuague	Agua estéril D	3 veces
Alcohol	70%	1min
Enjuague	Agua estéril D	3 veces

Fuente: CLIMACO HIO, Juan. Bogotá, 27 de Abril de 2005. [Entrevista personal]

Figura 2. Desinfección de riesgo



La desinfección preparativa se aplicó a los bulbillos sometidos a la desinfección de riesgo una vez se les eliminó la hoja de protección, su objetivo fue la evaluación de los tres tratamientos de desinfección sugeridos en la selección del más indicado para la etapa (Véase Tabla 3). Se realizaron 3 siembras de 45 explantes cada una para las dos variedades de estudio con un total de 270 explantes tratados, 135 de Ajo Rubí-1 y 135 de Ajo criollo. Se aclara que el tratamiento número tres no se presentó en la propuesta original y su ensayo se aplicó buscando mejores resultados en esta etapa.

Tabla 3. Tratamientos de desinfección evaluados

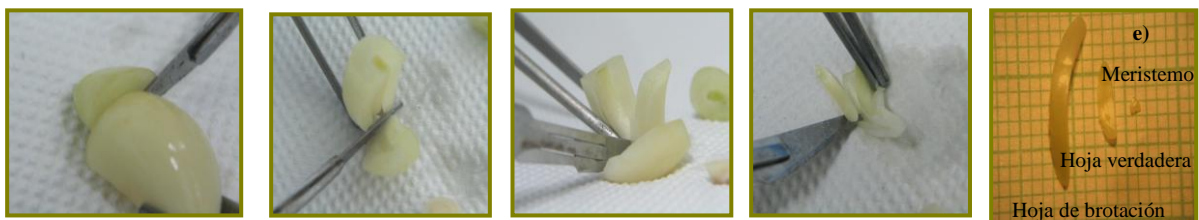
Parámetros	Tratamiento 1		Tratamiento 2		Tratamiento 3	
	Condiciones	Tiempo	Condiciones	Tiempo	Condiciones	Tiempo
Antiséptico	Extrán 2%	20min	Detergente 2%	20min	Isodine 5%	20min
Enjuague	Agua estéril*	3 veces	Agua estéril*	3 veces	Agua estéril*	3 veces
Hipoclorito	-	-	-	-	De Sodio 5%	10min
Enjuague	-	-	-	-	Agua estéril*	3 veces
Etanol	70%	2min	70%	1min	70%	1min
Enjuague	Agua estéril*	3 veces	Agua estéril*	3 veces	Agua estéril*	3 veces
Hipoclorito	De Sodio 13%	20min	De Sodio 5%	15min	De Calcio 1%	10min
Enjuague	Agua estéril*	5 veces	Agua estéril*	5 veces	Agua estéril*	5 veces

*Destilada y deionizada.

- **Fase II.** Ensayo de los tratamientos propuestos para el cultivo “in vitro” de Ajo var. Rubí-1 y criollo, determinando la concentración y la combinación óptima de los reguladores de crecimiento.

Etapa I: establecimiento o introducción. Una vez determinado el proceso de desinfección adecuado en la fase I, los bulbillos de cada una de las variedades se sometieron a dicho tratamiento y posteriormente se les extrajo asépticamente el meristemo con 1 ó 2 primordios foliares (0.5 a 2mm) en cámara de flujo laminar (Véase Figura 3).

Figura 3. Proceso de extracción aséptica del meristemo de ajo: a) Corte horizontal del bulbillito. b) Corte vertical del bulbillito. c) Eliminación de la hoja protectora. d) Eliminación de las hojas verdaderas y primordios. e) Meristemo.



Este explante se sembró en un contenedor de vidrio (42x107mm) debidamente marcado y numerado con 15ml del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962) formulado para el proceso (Anexo A) y suplementado con combinaciones de los reguladores de crecimiento auxina-citoquinina propuestas para la etapa.

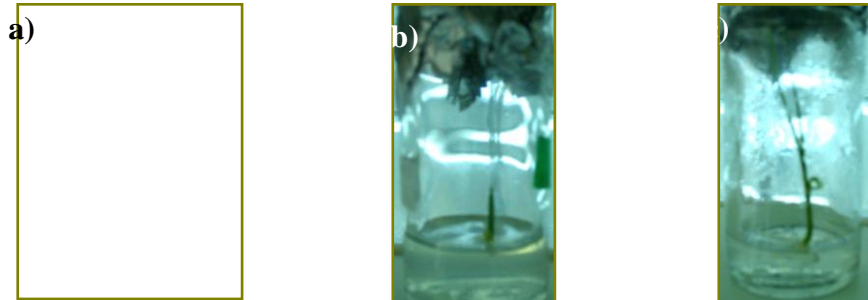
Se desarrolló un diseño experimental de bloques completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 3 \times 3 = 18$ tratamientos (Véase Tabla 4). El primer factor evaluado fueron los dos reguladores auxínicos de crecimiento Acido Indol Acético (AIA) y Ácido Naftaleno Acético (ANA), el segundo factor fueron las tres concentraciones de dichos reguladores en niveles de 0, 0.5 y 1mg/l y el tercer factor las tres concentraciones del regulador de crecimiento Kinetina (KIN) en niveles de 0, 0.1 y 0.5mg/l. Se hicieron 3 siembras por experimento para cada variedad (cada siembra es igual a un bloque).

Tabla 4. Tratamientos evaluados en la etapa de iniciación o establecimiento

Combinación reguladores de crecimiento		
Concentración (mg/l)		
Auxina	Citoquinina	Tratamiento
AIA	KIN	
0.1	0	1
0.1	0.1	2
0.1	0.5	3
0.5	0	4
0.5	0.1	5
0.5	0.5	6
1.0	0	7
1.0	0.1	8
1.0	0.5	9
ANA	KIN	Tratamiento
0.1	0	10
0.1	0.1	11
0.1	0.5	12
0.5	0	13
0.5	0.1	14
0.5	0.5	15
1.0	0	16
1.0	0.1	17
1.0	0.5	18

El número de repeticiones por tratamiento fue de 10 en cada siembra, evaluándose 8 unidades experimentales en cada una. En total se sembraron 540 explantes de ajo Rubí-1 y 540 de ajo criollo pero se evaluaron 432 de cada variedad. Los explantes introducidos se llevaron al cuarto de crecimiento durante 6 semanas (Véase Figura 4).

Figura 4. Plántulas de ajo en etapa de establecimiento: a) Cuarto de crecimiento. b) Plántula de ajo Rubí-1. c) Plántula de ajo criollo.



Etapa II: Multiplicación. Una vez establecidos los explantes en los cuatro mejores tratamientos de introducción, se transfirieron a medio de multiplicación. Durante esta etapa se realizaron dos ensayos

Primer ensayo. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial $3 \times 4 = 12$ tratamientos, donde el primer factor fue la combinación de los reguladores de crecimiento auxina/citoquinina, utilizando las auxinas Ácido Indol Butírico (AIB), AIA y ANA y la citoquinina Kinetina para obtener los niveles AIA/KIN, AIB/KIN y ANA/KIN, en concentración de 0.1mg/l de auxina y 0.1mg/l de citoquinina. El segundo factor: tratamientos de introducción, lo conformaron los cuatro mejores tratamientos de la etapa I (Véase Tabla 5).

Tabla 5. Tratamientos del primer ensayo de la etapa de Multiplicación

Combinación de reguladores de crecimiento (0.1/0.1mg/l)	Tratamiento Introducción*	Tratamiento
AIA/KIN	1M	19
AIA/KIN	2M	20
AIA/KIN	3M	21
AIA/KIN	4M	22
AIB/KIN	1M	23
AIB/KIN	2M	24
AIB/KIN	3M	25
AIB/KIN	4M	26
ANA/KIN	1M	27
ANA/KIN	2M	28
ANA/KIN	3M	29
ANA/KIN	4M	30

*1M: primer mejor tratamiento etapa 1, 2M: segundo mejor tratamiento etapa 1, 3M: tercer mejor tratamiento etapa 1, 4M: cuarto mejor tratamiento etapa 1.

Las plántulas establecidas se sembraron un contenedor de vidrio (42x107mm) con 15ml de medio. Una vez se realizó el pase de multiplicación, los explantes se llevaron al cuarto de crecimiento durante 6 semanas. El número de repeticiones, fue limitado a los resultados de la etapa de establecimiento manejándose 24 repeticiones en cada uno de los tratamientos.

Segundo ensayo. Debido a los resultados mostrados por los explantes para la tasa de multiplicación en los diferentes medios evaluados, se programó el uso del regulador de crecimiento dimetil alilaminopurina o 2- isopentenil 1-adenina (2ip) con ANA en las concentraciones sugeridas por la FAO, 1989 (Bhojwani (1980) modificado) y Moriconi, 1990 (En FAO, 1991).

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x4 = 8 tratamientos, donde el primer factor fue la concentración de la combinación de los reguladores de crecimiento 2ip/ANA formada por los niveles Moriconi, 1990 y FAO, 1991 con 3 mg/l de 2-ip y 0.3 mg/l de ANA el nivel Moriconi y 0.5 mg/l de 2-ip y 0.1 mg/l de ANA el nivel FAO. El segundo factor: tratamientos de introducción, lo conformaron los cuatro mejores tratamientos de la etapa I (Véase Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos del segundo ensayo de la etapa de Multiplicación

Autores	Concentración 2ip/ANA (mg/l)	Tratamiento Introducción*	Tratamiento
Moriconi (1990)	3.0/0.3	1M	31
		2M	32
		3M	33
		4M	34
FAO	0.5/0.1	1M	35
		2M	36
		3M	37
		4M	38

*1M: primer mejor tratamiento etapa 1, 2M: segundo mejor tratamiento etapa 1, 3M: tercer mejor tratamiento etapa 1, 4M: cuarto mejor tratamiento etapa 1.

Las plántulas establecidas se sembraron un contenedor de vidrio (42x107mm) con 15ml de medio. Una vez se realizó el pase de multiplicación, los explantes se llevaron al cuarto de crecimiento durante 6 semanas. El número de repeticiones fue de 20 por variedad, para cada uno de los tratamientos.

Figura 5. Desarrollo de plántulas de ajo en etapa de multiplicación: a) Variedad ajo Rubí-1 b) Variedad ajo Criollo.



- **Fase III.** Evaluación de los tratamientos propuestos para la obtención de microbulbillos o semilla prebásica de Ajo var. Rubí-1 y Criollo, determinando la concentración adecuada de sacarosa.

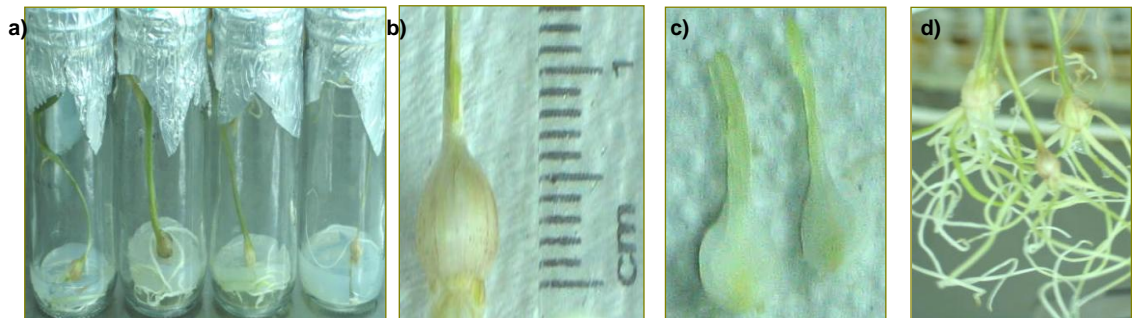
Etapa III: Microbulbificación. Se trabajó un diseño experimental completamente al azar en el cual se ensayaron cuatro dosis de sacarosa con el mejor tratamiento de la etapa anterior. Las plántulas de mayor desarrollo en el medio de multiplicación seleccionado, se colocaron en los medios de microbulbificación formulados con sales MS y con la adición de 4 concentraciones diferentes de sacarosa (Véase Tabla 7).

Tabla 7. Tratamientos evaluados en la etapa de Microbulbificación

Sacarosa (g/l)	Tratamiento
40	39
50	40
60	41
90	42

El número de repeticiones fue 20 por tratamiento para cada variedad. Las plántulas se sembraron un frasco de vidrio (42x107mm) con 15ml de medio y se llevaron al cuarto de crecimiento por 6 semanas (Véase Figura 6).

Figura 6. Desarrollo de plántulas de ajo en la etapa de microbulbificación: a) Microbulbillos formados en diferentes tratamientos. b) Desarrollo y crecimiento de un microbulbillos de ajo. c) Corte longitudinal a un microbulbillo de ajo. d) Desarrollo de raíces en plántulas con microbulbillos.



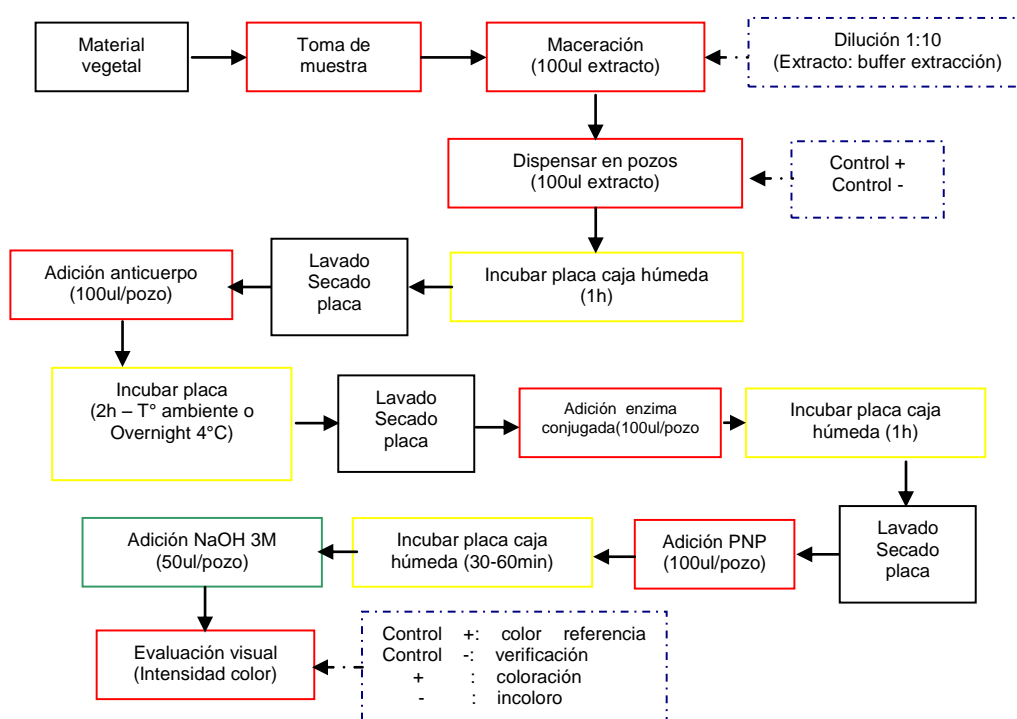
- **Fase IV.** Indexación fitosanitaria de las plántulas establecidas a Potyvirus mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Se aplicó la técnica inmunoenzimática ELISA indirecto a Potyvirus con el kit CAB 27200/0500 Agdia inc® (Veáse Figura 7). Se procesaron muestras de follaje tomadas del cultivo, de plántulas “in vitro” y de la hoja de almacenamiento de cada variedad de ajo. Se realizaron 6 montajes ELISA analizándose 562 muestras (Véase Tabla 8).

Tabla 8. Muestras de ajo Rubí-1 y Criollo analizadas con la técnica ELISA indirecto para potyvirus

Material analizado	Cantidad de muestras analizadas
Muestras foliares Ajo Rubí-1	10
Muestras bulbos Ajo Rubí-1	10
Muestras foliares cultivo de meristemos Ajo Rubí-1	402
Muestras foliares Ajo criollo	10
Muestras bulbos Ajo criollo	10
Muestras foliares cultivo de meristemos Ajo criollo	120

Figura 7. Esquema protocolo ELISA Indirecto Agdia®



Fuente: AGDIA. Indirect ELISA, alkaline phosphatase label. [citado en marzo de 2005].
Disponible en internet: <URL:http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi?m23.1>

1.3 ANALISIS DE LA INFORMACIÓN

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rangos múltiples de Tukey para detectar diferencias entre los tratamientos respecto a las diferentes variables evaluadas en cada una de las fases propuestas. Los datos se analizaron con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.

2. ANALISIS DE RESULTADOS

2.1 FASE I: ETAPA PREPARATIVA

En esta fase se logró la determinación de un protocolo de desinfección eficiente que permite eliminar los microorganismos presentes en los explantes a introducir, consiguiendo un cultivo axénico en la fase de establecimiento. Durante esta etapa se tuvieron en cuenta las características del material seleccionado y se evaluaron los porcentajes de contaminación bacteriana, fúngica y de contaminación total, así como losl porcentaje de vitrificación y viabilidad de los explantes presente en cada una de las siembras para los tratamientos ensayados.

Selección del material vegetal. De 25 bulbos evaluados para cada variedad se encontró que el 67.73% y el 60.79% de los bulbos para las variedades Rubí-1 y Criollo, respectivamente, presentaron un tamaño mayor o igual a 2.5cm (Véase Tabla 9). Aunque la variedad ajo Rubí-1 presentó mayor número de bulbillos por bulbo (26.4), así como bulbillos mayor o igual a 2.5cm, la variedad Criollo logró un mayor peso por bulbillo (2.28g) e incluso presentó bulbillos de 4cm de longitud (Véase Anexo B).

Tabla 9. Evaluación de bulbillos de ajo Rubí-1 y criollo

Variedad	Bulbos	Bulbillos	Bulbillos/Bulbo	Bulbillos $\geq 2,5$	Peso (g)	Peso/ Bulbillo (g)
Rubí-1	25	660	26,4	447	32,19	1,82
Criollo	25	403	16,12	245	21,24	2,28

Determinación del tratamiento adecuado para la desinfección de patógenos bacterianos y fúngicos. Al analizar estadísticamente las variables hongo, bacteria y contaminación total en cada una de las siembras realizadas (Véase Tabla 10), se observó que no existen diferencias significativas para ninguna de las dos variedades (Véase Anexo C, Cuadros 1 y 2), aunque la Siembra 1 presentó la mayor contaminación bacteriana. La Siembra 2 se caracterizó por una disminución de la contaminación bacteriana y el aumentó de la contaminación fúngica la cual pudo deberse a la presencia de un hongo en el ambiente de trabajo o en la semilla donante debido a que a ésta no se realizó un análisis micológico y podría estar infectada con hongos sistémicos. Finalmente, en la siembra 3 se logró reducir a menos del 5% el nivel de contaminación total, pero siguió siendo alta la presencia fúngica.

Tabla 10. Comparación de las medias presentadas en las siembras por las variables Hongos, Bacterias y Contaminación Total en la Fase I según la prueba de Tukey

Variedad	Siembra	Hongo	Bacteria	Contaminación Total
Rubí-1	1	0,74 a	4,44, a	5,18 a
	2	3,70 a	2,22 a	5,92 a
	3	2,22 a	1,48 a	3,70 a
Criollo	1	2,22 a	4,44 a	6,66 a
	2	3,70 a	1,48 a	5,18 a
	3	3,70 a	0,74 a	4,44 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

Para la determinación del tratamiento de desinfección adecuado que permita obtener un cultivo axénico, se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos, estableciéndose las siguientes observaciones de acuerdo a las medias de las variables evaluadas (Véase Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de las medias presentadas en los tratamientos por las variables Hongos, Bacterias y Contaminación Total en la Fase I según la prueba de Tukey

Variedad	Tratamiento	Hongo	Bacteria	Contaminación Total
Rubí-1	1	4,44 a	6,66 a*	11,11 b**
	2	1,48 a	0,74 a	2,22 a
	3	0,74 a	0,74 a	1,48 a
Criollo	1	4,44 a	3,70 a	8,15 b*
	2	3,70 a	2,22 a	5,92 b
	3	1,48 a	0,74 a	2,22 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable con diferencias significativas.

** Variable con diferencias altamente significativas.

El análisis estadístico de las variables (Véase Anexo C, Cuadro 3) determinó en ajo Rubí-1 que el Tratamiento 1 presentó diferencias altamente significativas de los tratamientos 2 y 3 en la variable Contaminación Total. Sin embargo, aunque el ANOVA de la variable Bacteria muestra que existen diferencias significativas entre las medias, la comparación múltiple de rango según el Test de Tukey HSD mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, aún cuando el Tratamiento 1 presentó la mayor media de contaminación bacteriana. En ajo Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 4) el Tratamiento 3 presentó diferencias significativas en la variable Total contaminación; para las variables

Hongo y Bacteria no se presentaron diferencias estadísticamente significativas pero la mejor respuesta en efectividad de desinfección la mostró el Tratamiento 3 al analizar las dos variables.

Al analizar la variable Bacteria se observó que el Tratamiento 3 es el más efectivo y presenta diferencias significativas de los Tratamientos 1 y 2. Aunque el tratamiento 1 en ajo Rubí-1 alcanzó un 6.66% de este tipo de contaminación, se puede considerar que la presencia bacteriana en los explantes cultivados fue baja. Pérez (1999) afirma que la zona de tejido que se utiliza influye en la efectividad de la desinfección y que al usar tejidos asépticos como meristemos cubiertos por primordios de hojas u hojas jóvenes estos son más fáciles de desinfectar.

Debido a que el material vegetal utilizado (bulbillo) se encuentra protegido por diferentes hojas transformadas que cubren el explante (meristemo) y además es sometido a una desinfección de riesgo para disminuir la carga microbiana presente en las membranas externas para luego aplicar los tratamientos de desinfección evaluados, logrando eliminar los microorganismos que siguen presentes en la zona de la base radicular.

La variable hongos no presentó diferencias significativas para la variedad Rubí-1, sin embargo el menor crecimiento fúngico se dio en el tratamiento 3. Para la variable de contaminación total se presentaron diferencias altamente significativas de los tratamientos 3 y 2 respecto al tratamiento 1, presentándose en este último un 11.11% de desarrollo de microorganismos, mientras los tratamientos 3 y 2 alcanzaron 1.46 y 2.22%, respectivamente.

Viabilidad de los explantes ante los tratamientos evaluados. Al evaluar estadísticamente la variable viabilidad (Véase Tabla 12) se presentan diferencias significativas para las siembras más no para los tratamientos (Véase Anexo C, Cuadros 5 y 6), donde la siembra 3 con las mejores respuestas es diferente estadísticamente de la 1 en ajo Criollo y presenta diferencias altamente significativas en ajo Rubí-1. Aunque no existen diferencias significativas entre los tratamientos, el Tratamiento 1 alcanzó una menor viabilidad que los Tratamientos 2 y 3 en las dos variedades.

Analizando las concentraciones y los desinfectantes frente a la viabilidad presentada, la FAO (1989) afirma que un exceso de Hipoclorito de Sodio (10%) por un tiempo prolongado (20 minutos) asegura una desinfección eficiente y solo daña la hoja de almacenamiento pero no el meristemo caulinar.

Tabla 12. Comparación de las medias presentadas en las siembras y tratamientos por la variable Viabilidad de la Fase I según la prueba de Tukey

Variedad	Nivel	Viabilidad	
		Tratamiento	Siembra
Rubí-1	1	66,67 a	46,67 b**
	2	71,11 a	73,33 a
	3	73,33 a	91,11 a
Criollo	1	73,33 a	68,89 b*
	2	82,22 a	80,00 ab
	3	86,67 a	93,33 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable con diferencias significativas.

** Variable con diferencias altamente significativas.

Chaparro (1998) muestra que el efecto concentración de Hipoclorito y tiempo de exposición versus viabilidad de los explantes de ajo Rubí-1 al usar Hipoclorito de Sodio al 1% por 15 y 20 minutos permite obtener 70 y 50% de viabilidad, así como 100 y 80% de explantes libres de contaminación, logrando menor viabilidad pero mayor efectividad de desinfección. Sin embargo, Cuestas (2004) al utilizar concentraciones de 1 y 5% de Hipoclorito de sodio por 15 minutos en la desinfección de esta variedad obtuvo el mismo porcentaje de viabilidad (84%) y porcentajes de material libre de fitopatógenos de 68 y 92% respectivamente. Es decir, un aumento en la concentración del Hipoclorito de Sodio favoreció un mejor control de los agentes contaminantes, garantizando la misma viabilidad que aquel tratamiento que lograba un menor control debido a su concentración.

Gómez (1992) manifiesta que el uso de Hipoclorito de Calcio al 5% durante 15 minutos logra una viabilidad del 88 a 90% en meristemos de ajo Criollo y de 85% en ajo Vietnamita. Pero de acuerdo a la experiencia de Izquierdo (2000), el uso de Hipoclorito de Calcio al 5% por 20 minutos o de Hipoclorito de Sodio al 10% con 5% de cloro activo (al 0.5%) por 15 minutos permiten lograr igual de efectividad en la desinfección, sobrevivencia y vigor de los explantes de los clones de ajo Criollo-3, Criollo-6, Criollo-9, Martínez y Vietnamita. Es decir, que el uso de Hipoclorito de Calcio a una alta concentración no afecta el desarrollo y crecimiento de los explantes y su acción es igual a la del Hipoclorito de Sodio a baja concentración. Se puede establecer, entonces, que las diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los desinfectantes afectan la viabilidad de los explantes y la eliminación de los microorganismos, llegando cada variedad a manifestar un comportamiento distinto a otra, por ello es necesario la aplicación de ensayos y sus evaluaciones, para determinar el tratamiento más favorable para una variedad.

Desarrollo del fenómeno de vitrificación durante la etapa preparativa. Durante la siembra 1 y parte de la siembra 2 se presentó la aparición del fenómeno de vitrificación en

porcentajes altos, afectando notoriamente los explantes de la variedad de ajo Rubí-1 y ajo Criollo. Debido a que en el establecimiento de cultivo “in vitro” de aliáceas“, las condiciones ambientales dentro y fuera del contenedor, pueden permitir que el fenómeno de vitrificación se presente en gran porcentaje, generando pérdidas debido a degeneración de los tejidos e incluso, en procesos de implementación del cultivo “in vitro” de ajo y cebolla de rama llega a impedir avances si no se determinan las causas que benefician este fenómeno, afectando notoriamente la tasa de multiplicación de las variedades de interés. Kamstaityle y Stanys (2004) expresa que la vitrificación de los tejidos es junto con la formación de bulbos, la dormancia de las plántulas y la disminución en la capacidad de regeneración unos de los factores que limitan la eficiencia de la micropropagación de cebolla.

Polo (1992) manifiesta que la vitrificación es causada debido exclusivamente a las condiciones “in vitro” entre ellas, las altas concentraciones de fitoreguladores, especialmente citoquininas, de iones nitrato (NH_4), de potencial de agua, de humedad relativa, de temperatura, de gas carbónico y el tipo y concentración del gelificante. López (199?) afirma que este desorden se manifiesta especialmente en las hojas mientras los tallos y raíces son afectados en menor medida, siendo los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso los afectados e impidiendo el normal establecimiento de las plantas micropropagadas a condiciones “ex vitro”.

Hernández y Mancipe (1997) consideran que el daño mecánico ocasionado al meristemo durante el proceso de aislamiento y cultivo “in vitro” de ajo comercial favoreció el desarrollo de un 15 a 20% de folíolos anormales y con crecimiento en forma de roseta que rara vez formaron plántulas completas normales debido a que las estructuras foliares se atrofiaron tornándose cristalinas y traslúcidas. Cuesta (2004) reporta el desarrollo de malformaciones en los explantes de ajo Rubí-1 debido a hiperhidracidad de los tejidos causado por la fusión del medio de cultivo (sólido a líquido) por temperaturas superiores a 20°C en el cuarto de crecimiento.

Para contrarrestar este desorden fisiológico se tomaron medidas correctivas para la siembra 3, tales como: cambio del gelificante del medio de cultivo utilizado (phytagel) por agar (Merck) lavado a una concentración inicial de 13.5g/500ml de ADD, realizando 4 a 5 lavados y midiendo conductividad entre cada lavado hasta obtener un valor en la conductividad igual a 0. Así mismo, se utilizó Vinipel (lámina plástica) para el sellado de los contenedores en lugar de papel aluminio para aumentar la disponibilidad lumínica e incrementar la actividad fotosintética.

De igual manera se realizaron arreglos en el sistema de aire, el cual presentó desajustes durante las siembra afectadas con este fenómeno, y que causaron problemas de temperaturas en el cuarto de cultivo frío (16-20°C), con variaciones entre 19°C y 31°C; se

realizó un control y seguimiento de las temperaturas y condiciones ambientales del cuarto de crecimiento que permitieron disminuir la incidencia de este fenómeno. Las siembras de la Fase II se realizaron en medio de cultivo gelificado con 8.5g/l de agar phytothecnology (Agdia) el cual es de mayor pureza y adecuado para el cultivo de tejidos vegetales, y no precisa ser lavado.

La disminución del porcentaje de vitrificación demostraron que las acciones tomadas fueron efectivas para la disminución de este desorden fisiológico y que las condiciones que generan la aparición de la vitrificación no esta relacionada con los tratamientos de desinfección aplicados sino con aspectos vinculados con el desarrollo de los explantes en el medio de cultivo como fueron el tipo y la concentración del gelificante y las condiciones ambientales del cuarto de cultivo. Los contenedores de vidrio se continuaron sellando con papel aluminio una vez se estabilizó el porcentaje de vitrificación.

El análisis del fenómeno de vitrificación o hiperhidratación (Véase Tabla 13) mostró que para ninguna de las variedades existen diferencias significativas entre los tratamientos aún cuando el Tratamiento 1 presenta la mayor media. Sin embargo, al evaluar la variable frente a las siembras, la siembra 3 presentó diferencias altamente significativas de las siembras 1 y 2, al ser la que menos desarrolló este fenómeno (Véase Anexo C, Cuadros 7 y 8).

Tabla 13. Comparación de las medias presentadas en las siembras y tratamientos por la variable Vitrificación de la Fase I según la prueba de Tukey

Variedad	Nivel	Vitrificación	
		Tratamiento	Siembra
Rubí-1	1	42,22 a	64,44 c**
	2	26,67a	31,11 b
	3	28,89 a	2,22 a
Criollo	1	33,33 a	46,67 b**
	2	24,45 a	28,89 b
	3	22,22 a	4,45 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

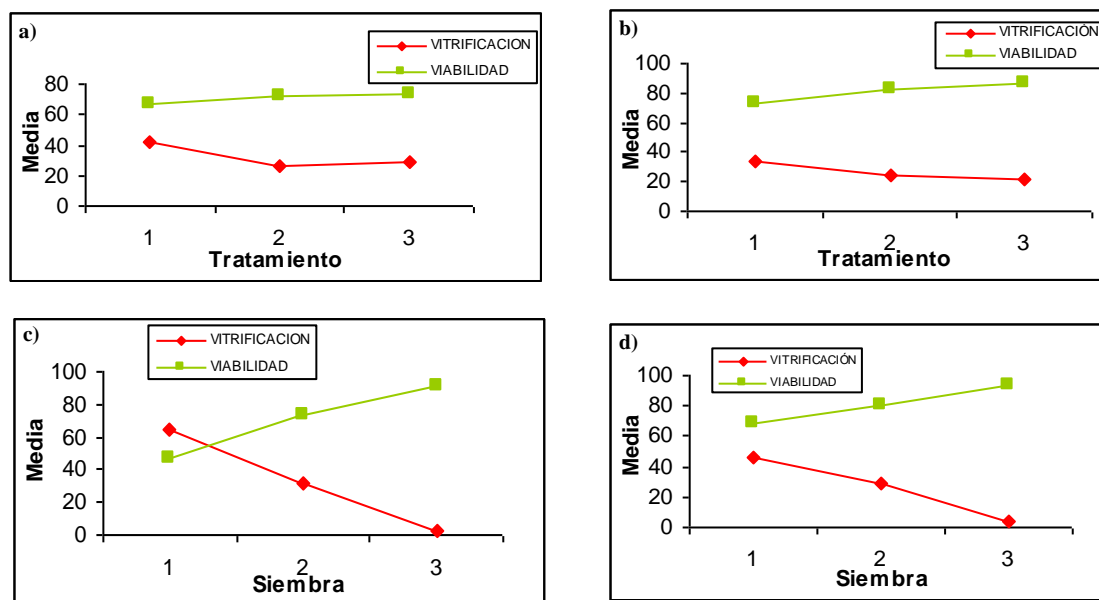
* Variable con diferencias significativas.

** Variable con diferencias altamente significativas.

Si observamos el Gráfico 1, en la cual se comparan el comportamientos de las variables Viabilidad y Vitrificación ante los tratamientos (Véase Gráfico 1a y 1b) y las siembras (Véase Gráfico 1c y 1d) en las dos variedades, vemos que a medida que hay una disminución en la vitrificación la tendencia de la viabilidad es hacia el aumento, es decir,

que el control del fenómeno de vitrificación favorece directamente la adaptación y el desarrollo de explantes viables.

Gráfico 1. Comparación del comportamiento de las variables Viabilidad y Vitrificación en la Fase I. a) Variedad ajo Rubí-1 ante los tratamientos. b) Variedad ajo Criollo ante los tratamientos. c) Variedad ajo Rubí-1 ante las siembras. e) Variedad ajo Criollo ante las siembras.



Una vez analizados estadísticamente el comportamiento de las diferentes variables ante los tratamientos de desinfección evaluados con las variedades de ajo de interés, quedó determinado que el Tratamiento 3 es el mejor tratamiento para la obtención de plántulas establecidas de ajo Rubí-1 y Criollo libres de microorganismos con un porcentaje de viabilidad favorable para el proceso de producción masiva.

2.2 FASE II: ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

Durante esta fase se pretendió, en primer lugar, determinar un medio de cultivo que permita el desarrollo exitoso de los meristemos introducidos para la obtención de plántulas vigorosas y libres de microorganismos endógenos, exógenos y vasculares. Se evaluó para las dos variedades la altura y el número de hojas producidas por los explantes en los diferentes medios para cada una de las tres siembras, así como para el promedio de siembra total; a la variedad Criollo se le evaluó, además, el número de raíces, debido a su desarrollo durante la etapa. De esta manera se determinó la concentración y combinación de los

reguladores de crecimiento que favoreció el mejor crecimiento y desarrollo de los explantes.

Se evaluaron igualmente, los porcentajes de contaminación, viabilidad y vitrificación presentados en las siembras. A los 540 explantes introducidos en las tres siembras (30 por tratamiento) se evaluaron las variables contaminación, viabilidad y vitrificación para el total de explantes introducidos (Véase Tabla 14), pero solo 432 (24 por tratamiento) se evaluaron para la determinación de los 4 mejores tratamientos para cada variedad en la etapa.

Tabla 14. Variables evaluadas en la etapa de establecimiento en ajo Criollo

Siembra	Porcentajes en Ajo Rubí-1			Porcentaje en Ajo Criollo		
	Contaminación fúngica	Vitrificación	Viabilidad	Contaminación fúngica	Vitrificación	Viabilidad
1	1,66	1,48	91,67	0,93	1,30	90,00
2	1,11	2,04	93,33	0,56	1,85	85,00
3	0,55	0,56	89,44	0,19	1,48	88,70
TOTAL	3,32	4,08	92,96	1,68	4,63	87,90

Al observar los resultados obtenidos respecto a estas tres variables vemos que sólo se presentó contaminación por hongos en todas las siembras. Esta fue disminuyendo gradualmente, aunque en ajo Rubí-1 fue mayor su manifestación, indicando, por los bajos porcentajes en que se manifestó, un adecuado manejo de las condiciones de manejo del material y de asepsia ambiental, sin embargo cabe destacar que se hace necesario implementar un análisis micológico de la semilla que permita evaluar su calidad fitosanitaria y determinar con mayor precisión la condiciones que favorecen el desarrollo de hongos durante la etapa de establecimiento. El fenómeno de vitrificación logró porcentajes bajos por siembra, debido a la implementación de las medidas adecuadas para la eliminación de este desorden fisiológico. De igual manera, el porcentaje de viabilidad promedio es un buen indicativo de excelentes condiciones en el desarrollo de esta etapa y valida, junto con los resultados de las otras variables, una buena elección del tratamiento de desinfección y de las condiciones de extracción e introducción de los meristemos.

Quezada (1998) considera que el elevado porcentaje de establecimiento de meristemos libres de contaminación, mayor a 90%, de ajo Rosado de Italia y Colorado de Mendoza se debió a que se contaba con un buen protocolo de desinfección inicial de los explantes.

El análisis de varianza de las variables Altura, Número de Hojas y Número de Raíces en las diferentes siembras frente a los factores Auxina, Nivel de auxina y Nivel de Kinetina, y a las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina”, “Auxina * Nivel de Kinetina” y “Nivel de Auxina * Nivel de Auxina” permitieron establecer los comportamientos de las variedades Rubí-1 y Criollo ante las concentraciones y combinaciones hormonales propuestas.

Para la variable Altura (Véase Tabla 15) en cuanto a la auxina seleccionada, el AIA en las siembras 1 y 3 de ajo Rubí-1 presentó diferencias altamente significativas e inclusive en la siembra 2, que no presentó diferencias estadísticas entre las auxinas, mostró la mejor respuesta. En ajo Criollo tal comportamiento es similar, existiendo en la siembra 1 diferencias significativas, en la siembra 2 diferencias altamente significativas y para la siembra 3 no se presentan diferencias. En general, para las dos variedades el AIA presenta la mejor respuesta en el desarrollo promedio de los explantes introducidos (Véase Anexo C, Cuadro 9), favoreciendo el mayor crecimiento de los mismos, alcanzando una mayor longitud promedio de crecimiento los explantes de ajo Criollo con 1.97cm mientras ajo Rubí-1 alcanzó 1.59cm.

Tabla 15. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey para la altura de las plántulas en las siembras de la etapa de establecimiento

Efectos	Factor/ Nivel	Rubí-1				Criollo			
		Siembra 1	Siembra 2	Siembra 3	Promedio	Siembra 1	Siembra 2	Siembra 3	Promedio
Auxina	AIA	1,68 a**	1,56 a	1,52 a**	1,59 a**	2,02 a*	2,01 a**	1,88 a	1,97 a**
	ANA	1,31 b	1,51 a	1,31 b	1,38 b	1,71 b	1,75 b	1,89 a	1,78 b
Nivel de Auxina	0,1	1,64 a*	1,63 a	1,56 a**	1,61 a**	2,39 a**	2,21 a**	2,17 a**	2,26 a**
	0,5	1,39 b	1,56 a	1,40 ab	1,45 b	1,67 b	1,80 b	1,83 b	1,77 b
	1	1,46 ab	1,41 a	1,28 b	1,38 b	1,53 b	1,64 b	1,65 c	1,60 b
Nivel de Kinetina	0	1,63 a**	1,61 a	1,57 a**	1,60 a**	1,98 a	1,75 b*	1,84 b**	1,86 a
	0,1	1,56 a	1,54 a	1,39 ab	1,49 a	1,84 a	1,98 a	2,02 a	1,95 a
	0,5	1,30 b	1,48 a	1,28 b	1,34 b	1,77 a	1,92 ab	1,79 b	1,83 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable con diferencias significativas.

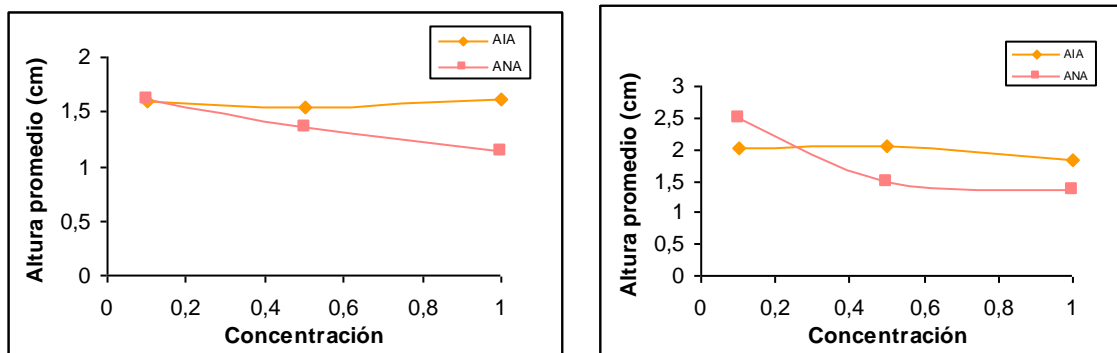
** Variable con diferencias altamente significativas.

En cuanto a los niveles de auxina, en las tres siembras de ajo Criollo para la variable altura se presentaron diferencias altamente significativas que favorecen la concentración hormonal de 0.1mg/l respecto a las concentraciones de 0.5 y 1 mg/l, concentración que presentó las mejores medias en ajo Rubí-1, aun cuando sólo en la siembra 3 mostró diferencias altamente significativas. Los niveles de kinetina en ajo Rubí-1 mostraron para todas las siembras como mejor concentración 0mg/l, la cual es estadísticamente igual a 0.1mg/l. Sin embargo, aunque en ajo Criollo la evaluación final de las siembras no presentó

diferencias significativas entre las diferentes concentraciones, 0.1mg/l permite alcanzar los mejores resultados en esta variedad (1.95cm). De acuerdo a lo analizado, se puede decir que el tratamiento suplementado con AIA 0.1mg/l y KIN 0.1mg/l es uno de los mejores para el desarrollo de los meristemos de ajo Criollo. Esta misma combinación de reguladores hormonales puede utilizarse para ajo Rubí-1 permitiendo buenos resultados, o bien puede sólo adicionarse AIA 0.1mg/l disminuyendo costos.

En cuanto al comportamiento de la variable altura en las variedades de estudio, ante las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina”, “Auxina * Nivel de Kinetina” y “Nivel de Auxina * Nivel de Auxina” (Véase Anexo C, Cuadros 10 y 11), se observó que para la interacción “Auxina * Nivel de Auxina” (Véase Gráfico 2b) el ajo Criollo mostró diferencias altamente significativas para las distintas concentraciones de los reguladores de crecimiento analizados. La mejor altura promedio se obtuvo al usar ANA a 0.1mg/l, pero a medida que se aumentó su concentración disminuyó su respuesta favorable, en tanto que, la tendencia del AIA en las diferentes concentraciones, fue hacia la estabilidad entre 0.1 y 0.5mg/l disminuyendo a 1mg/l.

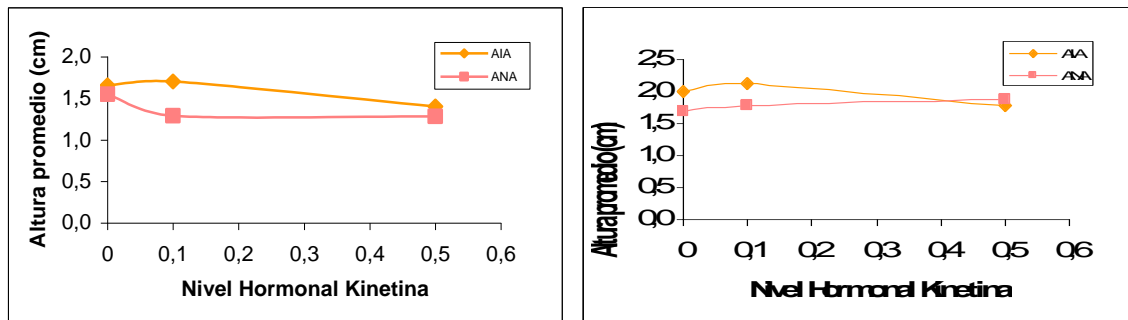
Gráfico 2. Comportamiento de la altura de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina” en la etapa de establecimiento. a) Ajo Rubí-1. b) Ajo Criollo.



En ajo Rubí-1 también se presentaron diferencias altamente significativas, estando las mejores respuestas para la interacción “Auxina * Nivel de Auxina” (Véase Gráfico 2a) de la variable altura en los niveles de los reguladores de crecimiento de 1mg/l de AIA o 0.1mg/l de ANA. Sin embargo, el comportamiento de los explantes es más estable con las diferentes concentraciones AIA, presentando el nivel 0.1mg/l una respuesta similar a la de 1mg/l. Estas concentraciones de ANA y AIA (0.1mg/l) para las variedades Criollo y Rubí-1 son ideales para la etapa de establecimiento del proceso productivo de ajo “in vitro”, ya que permiten el ahorro de los reguladores hormonales, disminuyen los costos de producción y favorecen un buen crecimiento de los explantes.

La interacción “Auxina * Nivel de Kinetina”, presentó diferencias altamente significativas en la variedad de ajo Criollo (Véase Gráfico 3b) y significativas para ajo Rubí-1 (Véase Gráfico 3a) siendo las mejores combinaciones para el desarrollo de la altura de los explantes aquellas que usan AIA con 0 ó 0.1 mg/l de kinetina. De acuerdo con los análisis realizados, los tratamientos que favorecen el mejor desarrollo y crecimiento de los explantes son para ajo Criollo aquellos que tengan 0.1mg/l de AIA o de ANA con la adicción de 0 ó 0.1mg/l de kinetina y para ajo Rubí-1 0.1mg/l de AIA con la adicción de 0 ó 0.1mg/l de kinetina.

Gráfico 3 Comportamiento de la altura de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Kinetina” en la etapa de establecimiento. a) Ajo Rubí-1. b) Ajo Criollo.



Al analizar la variable número de hojas (Véase Anexo C, Cuadro 12) con el factor auxina se observó que no existen diferencias significativas para ninguna de las dos variedades (Véase Tabla 16) pero en la variedad Rubí-1 el AIA presentó la mejor respuesta con 1.18 hojas por explante. La variedad Criollo, aunque presentó las mejores medias para el ANA en las siembras 2 y 3, con el uso de cualquiera de las dos auxinas alcanza el mismo número de hojas por explante (1.30).

El efecto nivel de auxina no presentó diferencias significativas para la variedad Rubí-1, pero la concentración 0.1mg/l permite obtener las mejores medias de producción foliar (1.17). Este nivel favorece igualmente los mejores promedios en ajo Criollo y presenta diferencias altamente significativas frente a las demás concentraciones, siendo el número de hojas desarrollado en la variedad Criollo superior al de la variedad Rubí-1 (1.47). Para el efecto nivel de kinetina no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las siembras evaluadas en ajo Criollo, siendo el nivel 0mg/l el que favoreció una mejor respuesta de la variable. Así mismo, este nivel se destacó en ajo Rubí-1 por presentar diferencias altamente significativas que promovieron el desarrollo de 1.24 hojas por explante.

Tabla 16. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey para el número de hojas de las plántulas en las siembras de la etapa de establecimiento

Efectos	Factor/ Nivel	Rubí-1				Criollo			
		Siembra 1	Siembra 2	Siembra 3	Promedio	Siembra 1	Siembra 2	Siembra 3	Promedio
Auxina	AIA	1,19 a	1,17 a	1,18 a	1,18 a	1,306 a	1,319 a	1,264 a	1,30 a
	ANA	1,11 a	1,11 a	1,13 a	1,12 a	1,250 a	1,333 a	1,320 a	1,30 a
Nivel de Auxina	0,1	1,21 a	1,13 a	1,19 a	1,17 a	1,354 a*	1,438 a	1,438 a	1,41 a**
	0,5	1,13 a	1,17 a	1,13 a	1,14 a	1,333 a	1,292 a	1,208 a	1,28 ab
	1	1,13 a	1,13 a	1,15 a	1,13 a	1,146 a	1,250 a	1,229 a	1,21 b
Nivel de Kinetina	0	1,19 a	1,27 a**	1,25 a*	1,24 a**	1,354 a	1,354 a	1,354 a	1,35 a
	0,1	1,19 a	1,08 b	1,15 ab	1,14 b	1,230 a	1,313 a	1,270 a	1,27 a
	0,5	1,08 a	1,06 b	1,06 b	1,07 b	1,250 a	1,313 a	1,250 a	1,27 a

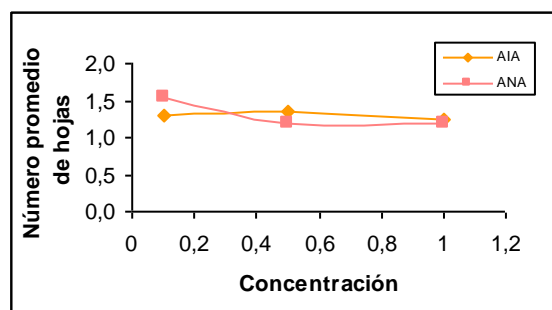
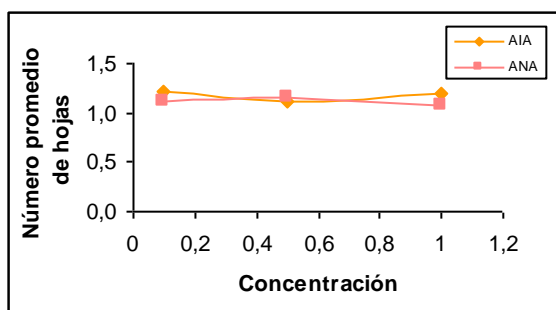
Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable con diferencias significativas.

** Variable con diferencias altamente significativas.

En cuanto al comportamiento de la variable hojas en las variedades de estudio ante las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina” y “Auxina * Nivel de Kinetina” (Véase Anexo C, Cuadros 13 y 14), se observó que para las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina” no existen diferencias significativas en ninguna de las 3 siembras de ajo Rubí-1 (Véase Gráfico 4a) presentándose promedios muy similares en los diferentes niveles hormonales. Sin embargo, los mejores resultados se dieron para el AIA a 0.1mg/l (1.22). En ajo Criollo se presentaron diferencias altamente significativas que permitieron establecer el nivel de ANA 0.1mg/l, como el mejor en el promedio de número de hojas desarrollado (Véase Gráfico 4b).

Gráfico 4. Comportamiento del número de hojas de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Auxina” en la etapa de establecimiento. a) Ajo Rubí-1. b) Ajo Criollo.



En las interacciones “Auxina * Nivel de Kinetina” no se presentaron diferencias significativas para la variedad Rubí-1 (Véase Gráfico 5a) y las mejores respuestas para el desarrollo foliar son dadas con el uso de KIN a 0.1mg/l con cualquiera de los dos reguladores auxínicos. Para la variedad Criollo la mejor respuesta se dio para AIA - KIN 0mg/l, aunque se observó una respuesta favorable con ANA - KIN 0.5mg/l (Véase Gráfico 5b). Como se puede observar los comportamientos de las variables altura y número de hojas son muy similares frente a los factores y niveles evaluados.

Debido a que los explantes de la variedad Criollo formaron algunas raíces, durante esta fase se realizó el análisis de varianza (Véase Anexo C, Cuadros 15 y 16).

Gráfico 5. Comportamiento del número de hojas de las plántulas ante las interacciones “Auxina * Nivel de Kinetina” en la etapa de establecimiento. a) Ajo Rubí-1. b) Ajo Criollo.

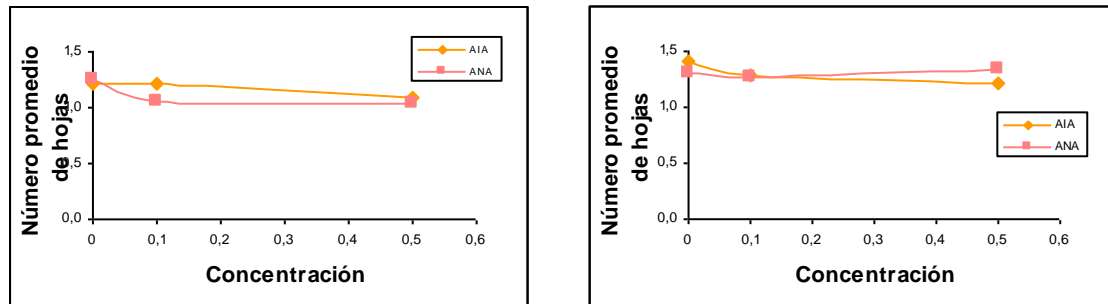


Tabla 17. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey para el número de raíces de las plántulas en las siembras de la etapa de establecimiento

Efectos Principales	Factor/ Nivel	Ajo Criollo			
		Siembra 1	Siembra 2	Siembra 3	Promedio
AUXINA	AIA	0,375 a	0,514 a	0,333 a	0,41 a
	ANA	0,292 a	0,375 a	0,486 a	0,38 a
NIVAUX	0,1	0,313 a	0,604 a	0,563 a	0,49 a*
	0,5	0,396 a	0,417 a	0,354 a	0,39 ab
	1	0,292 a	0,313 a	0,313 a	0,31 b
NIVKIN	0	0,438 a	0,521 a	0,500 a	0,49 a
	0,1	0,396 a	0,458 a	0,333 a	0,39 a
	0,5	0,167 a	0,354 a	0,396 a	0,31 a

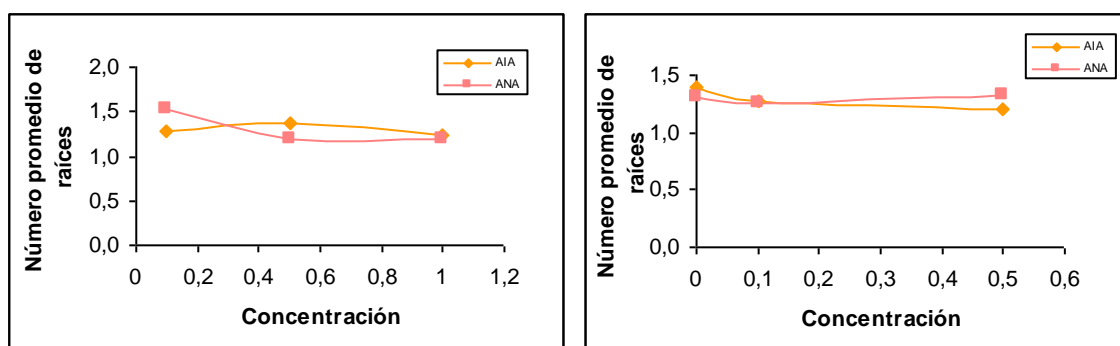
Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable con diferencias significativas.

Como se observa en la Tabla 17, el factor auxina la variable no presentó diferencias significativas en ninguna de las siembras pero los mejores resultados son para la auxina AIA. Para el efecto nivel de auxina, el nivel que promovió el mayor desarrollo de raíces fue 0.1mg/l presentando en general diferencias significativas con el nivel 0.5mg/l. En cuanto al nivel de kinetina, el mejor desarrollo de raíces se presentó a un nivel hormonal de 0mg/l, teniendo valores menores a mayor concentración hormonal.

Para la interacción “Auxina * Nivel de Auxina” (Véase Gráfico 6a) existen diferencias altamente significativas con las mejores respuestas a 0.1mg/l de ANA, mientras que para la interacción “Auxina * Nivel de Kinetina” no se presentaron diferencias significativas pero la mejor respuesta se dio para AIA-KIN 0mg/l (Véase Gráfico 6b).

Gráfico 6. Comportamiento del número de raíces de las plántulas de ajo Criollo en la etapa de establecimiento. a) Interacción “Auxina * Nivel de Auxina”. b) Interacción “Auxina * Nivel de Kinetina”.



Teniendo en cuenta los resultados de los tratamientos para las variables altura, número de hojas y número de raíces y la importancia de cada una se considero que la variable altura es la que mayor relevancia o valor tiene ya que permite determinar el buen desarrollo y crecimiento de los explantes ante los tratamientos a los que se sometieron. En el Tabla 18 se observa la prueba de comparación múltiple según Tukey para todos los tratamientos ensayados y los promedios arrojados para las diferentes variables en cada variedad (Véase Anexo C, Cuadros 17 y 18).

Los resultados para la variedad Criollo muestran la existencia de diferencias altamente significativas para las variables altura y número de hojas, mientras la variable número de raíces presenta diferencias significativas. Para la variable altura los cuatro mejores tratamientos fueron los tratamientos 11 (0.1mg/l ANA y 0.1mg/l KIN), 12 (0.1mg/l ANA y 0.5mg/l KIN), 2 (0.1mg/l AIA y 0.1mg/l KIN) y 4 (0.5mg/l AIA y 0 mg/l de KIN) los

cuales mostraron una altura promedio de 2.75, 2.69, 2.65 y 2.60 cm, respectivamente; se presenta además la no existencia de diferencias estadísticas entre los tratamientos 11 y 12. Se puede observar que los tratamientos 4, 12 y 11 son parte de los mejores tratamientos para la variable hojas y desarrollaron un número de 1.71, 1.58 y 1.54 hojas por explante, junto con el tratamiento 10 que permitió obtener 1.46 hojas por explante. Por su parte, los tratamientos 11, 4, 10,12 y 7 tuvieron las mejores respuestas en el número de raíces. Nuevamente los medios 11 y 4 se encuentran entre los mejores.

Tabla 18. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de hojas y el número de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en la etapa de establecimiento.

Tratamiento	Ajo Criollo			Ajo Rubí-1	
	Altura**	Hojas**	Raíces*	Altura**	Hojas**
1	1,62 cdef	1,33 ab	0,42 a	1,25 cdef	1,13 ab
2	2,65 ab	1,38 ab	0,38 a	2,08 a	1,42 a
3	1,80 cdef	1,17 b	0,25 a	1,46 bcdef	1,13 ab
4	2,60 ab	1,71 a	0,67 a	1,74 abcde	1,30 ab
5	1,93 cde	1,21 b	0,50 a	1,39 bcdef	1,13 ab
6	1,58 cdef	1,17 b	0,17 a	1,50 abcdef	1,04 b
7	1,83 cdef	1,17 b	0,54 a	1,98 ab	1,33 ab
8	1,77 cdef	1,25 ab	0,50 a	1,64 abcdef	1,13 ab
9	1,95 cd	1,29 ab	0,25 a	1,26 cdef	1,13 ab
10	2,04 bc	1,46 ab	0,58 a	1,92 abc	1,29 ab
11	2,75 a	1,54 ab	0,79 a	1,49 abcdef	1,04 ab
12	2,69 a	1,58 ab	0,54 a	1,44 bcdef	1,04 b
13	1,69 cdef	1,29 ab	0,50 a	1,83 abcd	1,33 ab
14	1,27 f	1,13 b	0,13 a	1,11 ef	1,08 ab
15	1,53 cdef	1,17 b	0,38 a	1,15 def	1,04 b
16	1,36 def	1,17 b	0,21 a	0,90 f	1,13 ab
17	1,31 ef	1,13 b	0,08 a	1,27 cdef	1,04 b
18	1,41 cdef	1,25 ab	0,25 a	1,67 cdef	1,04 b

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable con diferencias significativas.

** Variable con diferencias altamente significativas.

Para la variedad Rubí-1 se observa la existencia de diferencias altamente significativas para las variables altura y número de hojas, donde para la variable altura los cuatro mejores tratamientos fueron los tratamientos 2 (0.1mg/l AIA y 0.1mg/l KIN), 7 (1mg/l AIA y 0mg/l KIN), 10 (0.1mg/l ANA y 0mg/l KIN), y 13 (0.5mg/l ANA y 0 mg/l de KIN) los cuales mostraron una altura promedio de 2.08, 1.98, 1.92 y 1.83cm, respectivamente. Los tratamientos 2, 7,13 y 4 desarrollaron 1.42, 1.33, 1.33 y 1.30 hojas por explante. Los medios 2, 7 y 13 tuvieron buenos comportamientos en las dos variables evaluadas.

Quezada (1998) en su investigación determinó como el mejor tratamiento en el que se desarrollaron los explantes de los ecotipos de ajo evaluados fue el enriquecido con 0.1mg/l de AIA y 0.1mg/l de KIN (Tratamiento 2), medio propuesto por Conci et al (1986) y de gran aceptación en la implementación de procesos de cultivo “in vitro” de diferentes variedades de ajo (Alvarado, 2001; FAO, 1991). Investigadores como Conci(1991), Hernández y Mancipe(1997) e Izquierdo (2000) establecieron meristemos de ajo de diversos clones en medio MS suplementado con ANA 0.1mg/l y KIN 0.1mg/l (Tratamiento 11) obteniendo buenos resultados.

Por consiguiente, se seleccionaron los tratamientos 11, 12, 2 y 4 como los cuatro mejores tratamientos de la etapa de establecimiento de ajo Criollo y los tratamientos 2, 7, 10 y 13 para ajo Rubí-1. Para cada variedad en el orden en el que aparecen los tratamientos se denominan para la etapa de multiplicación como 1M (primer mejor tratamiento), 2M (segundo mejor tratamiento), 3M (tercer mejor tratamiento) y 4M (cuarto mejor tratamiento). Así mismo, se determinó que en 3 ó 4 semanas se obtienen explantes iguales o superiores a 1.5cm siendo el tamaño adecuado para realizar el traspaso de los explantes a la etapa de multiplicación.

2.3 FASE II: ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

Durante esta etapa se buscó la producción del mayor número posible de propágulos a partir de explantes ya establecidos “in vitro” (Pérez, 1998) determinando el número de subcultivos adecuados y el coeficiente de multiplicación de la variedad para cada subcultivo. Para determinar el medio de cultivo óptimo en la multiplicación de plántulas “in vitro” de ajo Criollo se evaluó el número de brotes por explante, la altura promedio de los brotes, el número promedio de hojas y de raíces por explante para los pases o subcultivos de multiplicación realizados. Se presentan los resultados para los dos ensayos realizados, pero se profundizará en el segundo ensayo debido a que permitió establecer el medio de cultivo de multiplicación.

Primer ensayo. Se analiza el comportamiento en dos subcultivos de las hormonas auxínicas AIA, AIB y ANA frente a los cuatro tratamientos seleccionados en la etapa de establecimiento.

En el Tabla 19, para el efecto Auxina/Kinetina en el primer subcultivo observamos para la variedad de ajo Rubí-1 que existen diferencias altamente significativas para las variables altura, donde la combinación ANA/KIN favoreció el mayor crecimiento. Esta combinación también fue la mejor para el número de hojas formado, y el mayor número de raíces se dio en AIA/KIN; ante el tratamiento de introducción, los tratamientos 7 y 13 presentan diferencias altamente significativas del tratamiento 2 para el crecimiento de los explantes,

mientras que los tratamientos 2 y 10 las presentan del 13 para el desarrollo de hojas. Se destaca para las dos variedades, la igualdad de datos para la variable brotes/explante, variable determinante para esta fase (Véase Anexo C, Cuadro 19).

Tabla 19. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el primer subcultivo del primer ensayo de multiplicación de ajo Criollo.

Efectos	Nivel	Ajo Rubí-1				Ajo Criollo			
		Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces	Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces
Auxina / Kinetina (0.1/0.1mg/l)	AIA / KIN	5,97 b**	1,00 N.A.	2,75 a	2,91 a	6,82 a	1,00 N.A.	2,81 a	3,19 a
	AIB / KIN	6,98 ab	1,00 N.A.	2,66 a	3,13 a	7,30 a	1,00 N.A.	2,97 a	3,13 a
	ANA/KIN	7,93 a	1,00 N.A.	2,88 a	2,83 a	7,16 a	1,00 N.A.	3,06 a	4,31 a
Tratamiento de Introducción	1M	6,06 b*	1,00 N.A.	2,96 a**	2,67 a	6,99 a	1,00 N.A.	2,92 a	3,67 a
	2M	7,53 a	1,00 N.A.	2,79 ab	3,0 a	7,38 a	1,00 N.A.	2,83 a	3,13 a
	3M	6,74 ab	1,00 N.A.	2,96 a	3,13 a	7,26 a	1,00 N.A.	3,33 a	3,29 a
	4M	7,48 a	1,00 N.A.	2,33 b	3,08 a	6,72 a	1,00 N.A.	2,69 a	4,13 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

N.A: no se puede analizar la variable porque todos los datos son iguales

* Variable que presenta diferencias significativas

** Variable que presenta diferencias significativas

En este primer subcultivo en la variedad de ajo Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 20), ningún efecto presentó diferencias significativas. Se observó, además, que los explantes sometidos a la combinación AIB/KIN presentaron un mejor crecimiento, mientras los sometidos a ANA/KIN manifestaron el mejor desarrollo foliar y radicular. En cuanto al efecto Tratamiento de Introducción, para ninguna de las variables existen diferencias significativas aún cuando los mejores promedios para la variable Altura la manifestaron los tratamientos 12 y 2, para la variable hojas la mejor respuesta la presentó el tratamiento 2, mientras el tratamiento 4 desarrolla la mayor media de raíces.

En el segundo subcultivo según se observa en el Tabla 20 la variedad Rubí-1 (Véase Anexo C, Cuadro 21) desarrolló los mejores promedios de crecimiento de los explantes y de formación de brotes/explante con el uso de AIB/KIN sin presentar las variables diferencias significativas, aunque para las variables número de hojas se presentan diferencias altamente significativas entre para el AIA/KIN y para la variable número de raíces ANA/KIN se presenta diferencias significativas. En cuanto al tratamiento de introducción, los tratamientos 2 y 7 presentaron las mejores respuestas para las variables brotes/explante y el tratamiento 10 fue el mejor para la formación hojas. Sin embargo, las variables no presentaron diferencias significativas entre tratamientos; las variables altura y

raíces presentaron diferencias significativas y altamente significativas para los tratamientos 7 y 2, respectivamente.

Tabla 20. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo subcultivo del primer ensayo de multiplicación de ajo Criollo.

Efectos	Nivel	Ajo Rubí-1				Ajo Criollo			
		Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces	Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces
Auxina / Kinetina (0.1/0.1mg/l)	AIA / KIN	7,05 a	1,18 a	5,22 a**	3,10 b*	7,43 a	1,74 a**	3,31 a	3,46 a
	AIB / KIN	7,81 a	1,26 a	3,43 b	3,25 ab	7,22 a	1,03 b	3,19 a	3,48 a
	ANA / KIN	7,63 a	1,25 a	3,78 b	3,71 a	7,39 a	1,25 b	3,28 a	3,34 a
Tratamiento de Introducción	1M	6,95 a*	1,25 a	3,92 a	3,89 a**	7,61 a	1,36 a	3,37 ab*	3,79 a*
	2M	8,07 a	1,25 a	4,04 a	3,25 ab	7,25 a	1,33 a	3,50 a	3,25 b
	3M	7,11 a	1,21 a	4,58 a	3,04 b	7,47 a	1,33 a	3,04 b	3,37 ab
	4M	7,87 a	1,22 a	4,04 a	3,25 ab	7,06 a	1,33 a	3,13 ab	3,30 ab

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable que presenta diferencias significativas

** Variable que presenta diferencias significativas

Para ajo Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 22) sólo se presentaron diferencias altamente significativas para el efecto auxina/kinetina en la variable brote/explante en el segundo subcultivo presentando la combinación AIA/KIN la mayor media de multiplicación, combinación que favoreció la mayor altura promedio. Para el efecto Tratamiento de Introducción las variables Altura y Brote/explante no existen diferencias significativas, mientras para las variables Hojas y Raíces se presentan diferencias significativas. El tratamiento 11 se destacó por favorecer un mejor crecimiento de los explantes (Altura), así como por presentar un buen desarrollo de las variables brote/explante, hojas y raíces.

La baja eficiencia de las diferentes combinaciones hormonales para favorecer la inducción de brotes durante la etapa de multiplicación, lo cual se debe al uso de una baja concentración y la citoquinina utilizada (kinetina) que no produjeron acción sobre el rompimiento de la dominancia apical de los explantes y la estimulación de brotes como se observó en el primer subcultivo, llevó a la necesidad en el segundo subcultivo de la realización de una escisión en la base apical. Sin embargo, la práctica de este corte no es recomendada porque estimula la formación de brotes adventicios incrementando la posibilidad de variabilidad somaclonal e inestabilidad genética (Burba, 1992; Pérez, 1998), incrementa la inversión de tiempo por parte de los operarios y no garantiza la obtención de los resultados esperados.

Segundo ensayo. Establecer el balance apropiado auxina – citoquinina del medio de multiplicación que favorezca una tasa de multiplicación efectiva en el proceso de micropropagación de ajo es el objetivo de la etapa y en el segundo ensayo en el cual se utilizaron 2ip y ANA en dos concentraciones diferentes se pudieron lograr resultados adecuados para la etapa.

Tabla 21. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por los tratamientos evaluados para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo ensayo de multiplicación de ajo Criollo.

Efectos	Nivel	Ajo Rubí-1				Ajo Criollo			
		Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces	Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces
Tratamiento 2ip	Moriconi (1990)	6,23 a	2,75 a	11,83 a	3,25 a	6,33 a	3,08 b**	10,20 b**	4,25 a
	FAO (1989)	6,45 a	2,90 a	11,03 a	3,57 a	6,87 a	3,7 a	12,97 a	4,27 a
	1M	7,13 a	3,50 a	12,10 a	4,20 a *	5,97 a	2,95 b	9,70 a	4,20b**
Tratamiento de Introducción	2M	7,11 ab**	3,15 a	10,45 a	3,10 ab	7,34 a	3,75 a	12,10 a	5,60 a
	3M	5,04 c	3,15 a	11,35 a	3,50 ab	6,89 a	3,75 a**	14,25 a	4,25 b
	4M	6,07 bc	3,00 a	11,80 a	2,85 b	6,22 a	3,10 ab	10,30 a	3,50 b

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable que presenta diferencias significativas.

** Variable que presenta diferencias altamente significativas.

Como se observa la Tabla 21, la variedad de ajo Rubí-1 presentó ante el tratamiento de 2ip propuesto por la FAO (1989) la mejor respuesta para la variable brote/explante, aun cuando no muestra diferencias significativas con el medio de Moriconi (1990) (Véase Anexo C, Cuadro 23). Este tratamiento dio los mejores resultados para las variables altura y número de raíces, variables que tampoco presentaron diferencias significativas. Para los tratamientos de introducción, el tratamiento 2 presentó las mejores respuestas en las diferentes variables aun cuando manifestó diferencias altamente significativas para las variables altura y significativas para la variable número de raíces, mientras las variables brotes/explante y número de hojas no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Analizando los dos tratamientos con 2ip en ajo Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 24) vemos que, existen diferencias altamente significativas para las variables brote/explantes y hojas, siendo el medio propuesto por FAO (1989) el que permite obtener una respuesta más favorable inclusive para las variables altura y raíces que no presentaron diferencias significativas. Como se observa para el efecto tratamiento de introducción no existen diferencias significativas para las variables Altura y Hojas mientras las variables brote/explante y raíces presentan diferencias altamente significativas para los tratamientos 2 y 12, respectivamente.

El medio Moriconi (1990) ha sido reportado en varias investigaciones con diferentes coeficientes de multiplicación. Es así como Racca (1989) obtiene 8 brotes/explante en 60 días con el uso de MS al 50% suplementado con 3ppm de 2ip y 0.3ppm de ANA en ápices caulinares o meristemas de ajos “Rosado Paraguayo” y “Blanco”. Alvarado (2001), a su vez, logró una tasa de multiplicación de 10.54, 12.57 y 9.14 para las variedades Chino, California y Perla al usar el medio de Moriconi (1990), resultados mejores que los obtenidos por Moriconi (1990) con las variedades Blanco y Colorado. Quezada (1998) logró 3.214 brotes/explante en ajo Colorado de Mendoza. Aunque los promedios presentados por las variedades de estudio no son iguales o superiores a los reportados en investigaciones similares, lo cual puede deberse al comportamiento de los genotipos analizados, se considera que entre los medios Moriconi (1990) y FAO (1989) las mejores respuestas son para el medio sugerido por la FAO (1989), lográndose disminuir notablemente el consumo de 2ip (de 3 mg/l a 0.5mg/l) y de ANA (de 0.3 mg/l a 0.1mg/l) reduciendo el consumo de estas materias primas, aminorando los costos de producción.

Tabla 22. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por la interacción “Tratamiento 2ip Moriconi * Tratamiento de Introducción” para la altura, el número de brotes/explante, hojas y raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo ensayo de multiplicación de ajo Criollo.

Nivel	Ajo Rubí-1				Ajo Criollo			
	Altura	Brotos/ explante	Hojas	Raíces	Altura	Brotos/ explante	Hojas	Raíces
31	6,73 ab**	3,00 a	13,9 a	3,30 a	5,34 b*	2,7 a	8,70 b**	3,90 b**
32	7,94 a	2,40 a	10,3 a	3,6 a	7,42 a	3,50 a	8,60 b	6,20 a
33	4,95 c	2,70 a	11,4 a	2,90 a	5,90 ab	3,30 a *	14,10 a	4,00 b
34	5,3 bc	2,90 a	11,7 a	3,2 a	6,69 ab	2,8 a	9,40 b	2,90 b

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable que presenta diferencias significativas.

** Variable que presenta diferencias altamente significativas.

Como se observa en el Tabla 22 que analiza la interacción “Tratamiento 2ip Moriconi * Tratamiento de Introducción” (Véase Anexo C, Cuadro 25), en ajo Rubí-1 la variable altura presentó diferencias altamente significativas del tratamiento 32 ante los demás tratamientos. Para la variable brotes/explante, número de hojas y de raíces no se presentaron diferencias significativas, pero el tratamiento 31 fue el que mayor número promedio de brotes desarrolló, seguido del tratamiento 34. La variedad Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 26) en las variables Altura y brotes/explante presentó diferencias significativas para el tratamiento 32. Las variables Hojas y Raíces presentaron diferencias altamente significativas para los tratamientos 33 y 34, respectivamente

Para la variedad de ajo Rubí-1, el análisis de la interacción “Tratamiento 2ip FAO * Tratamiento de Introducción” (Véase Anexo C, Cuadro 27) como se observa en la Tabla 23, presentó diferencias significativas de los tratamientos 35 y 36 para las variables altura y número de raíces. La variable brotes/explante a pesar de no mostrar diferencias significativas entre los tratamientos permite con el tratamiento 35 obtener 4 brotes por explante. La variedad Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 28) mostró en la variable altura que los tratamientos 36 y 37 presentaron diferencias altamente significativas respecto a los otros tratamientos, mientras la variable hojas presentó diferencias significativas. Sin embargo, no existen diferencias entre los tratamientos; la variable Raíces no presentó diferencias significativas al igual que la variable brote/explante, pero nuevamente la mejor respuesta para la variable se dio en los tratamientos 37 y 36.

Tabla 23. Comparación de los promedios presentados según la prueba de Tukey por la interacción “Tratamiento 2ip FAO * Tratamiento de Introducción” para la altura, el número de brotes/explante, de hojas y de raíces de las plántulas de las variedades Rubí-1 y Criollo en el segundo ensayo de multiplicación de ajo Criollo.

Nivel	Ajo Rubí-1				Ajo Criollo			
	Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces	Altura	Brotes/ Explante	Hojas	Raíces
35	7,49 a*	4,00 a	10,30 a	4,10 ab	6,61 ab**	3,20 a	10,70 a*	3,50 a
36	6,33 ab	3,90 a	12,40 a	4,80 a	7,27 a	4,00 a	15,60 a	5,00 a
37	5,13 b	3,10 a	9,50 a	2,90 ab*	7,88 a	4,20 a	14,40 a	4,50 a
38	6,85 a	3,10 a	11,90 a	2,50 b	5,75 b	3,40 a	11,20 a	4,10 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable que presenta diferencias significativas.

** Variable que presenta diferencias altamente significativas.

Podemos concluir que, las mejores respuestas para las variedades Rubí-1 y Criollo son gracias los tratamientos 35 y 37, tratamiento idénticos ya que, el primer mejor tratamiento de la fase de establecimiento en ajo Rubí-1 fue el tratamiento 2, el cual fue el 3 mejor tratamiento para ajo Criollo. Es decir, que este tratamiento es el indicado para la etapa de multiplicación tanto de ajo Rubí-1 y Criollo, por lo que se selecciona para el proceso productivo en la etapa de establecimiento el uso de AIA 0.1 mg/l y KIN 0.1 mg/l y para la etapa de multiplicación 2ip 0.5mg/l y ANA 0.1mg/l, debido a que permiten obtener una respuesta favorable en las variables de la etapa de establecimiento como es el buen crecimiento y desarrollo de los explantes a las condiciones “in vitro” y genera una buena tasa de multiplicación en ajo Criollo y Rubí-1.

Se realizaron tres siembras con la variedad Rubí-1 y dos con Criollo para determinar el coeficiente de multiplicación en cada subcultivo y el número de subcultivos necesarios para lograr la mayor producción de plántulas por meristemo en cada variedad.

Como se observa en el Tabla 24, aunque se forman microbulbillos espontáneamente, que mantienen la tasa de multiplicación, no se tienen en cuenta para iniciar el siguiente subcultivo debido al riesgo de desecamiento de las hojas e inicio del estado de dormición del microbulbillo, lo cual generaría un descenso mayor en la tasa de multiplicación de la variedad. La formación espontánea de microbulbillos en esta fase es un evento normal, como lo manifiesta Conci (2004) en el protocolo de micropropagación de ajo de REDBIOFAO.

Tabla 24. Coeficiente de multiplicación presentado en cada subcultivo en las siembras realizadas de ajo Criollo y Rubí-1

Variedad	Siembra	Subcultivo	Explantos Iniciales	Explantos finales	Microbulbos	Plántulas	Coeficiente
Criollo	1	1	15	23	7	16	1,53
		2	16	53	15	38	3,31
		3	38	62	12	50	1,63
		4	50	69	12	57	1,38
	2	1	13	17	2	15	1,31
		2	15	68	11	57	4,53
		3	57	69	26	43	1,21
		4	43	48	3	45	1,12
Rubí-1	1	1	25	50	6	44	2,00
		2	43	104	8	96	2,42
		3	86	129	9	120	1,50
		4	80	93	4	89	1,16
	2	1	27	44	9	35	1,63
		2	32	99	7	92	3,09
		3	90	152	12	140	1,69
		4	119	139	3	136	1,17
3	1	20	33	5	28	1,65	
	2	25	77	11	66	3,08	
	3	66	114	17	97	1,73	
	4	59	71	3	68	1,20	

Tanto para la variedad Rubí-1 como para Criollo en las diferentes siembras, el subcultivo número 2 es el que presenta el mejor coeficiente de multiplicación (Véase Gráfico 7) siendo estadísticamente diferente este subcultivo en ajo Criollo (Véase Anexo C, Cuadro 29), presentando un promedio 3.92 brotes/explantos mientras para ajo Rubí-1 presenta diferencias altamente significativas con un promedio de 2,86 (Véase Tabla 25). El mayor índice de propagación en ajo Criollo sugiere una dependencia del genotipo (Castillo, 1998;

Pérez, 1998; Izquierdo, 2000) debido a sus características fisiológicas (Moriconi, 1990 en Quezada, 1998).

Gráfico 7. Coeficiente de multiplicación presentado en cada subcultivo en las siembras realizadas de ajo Criollo y Rubí-1

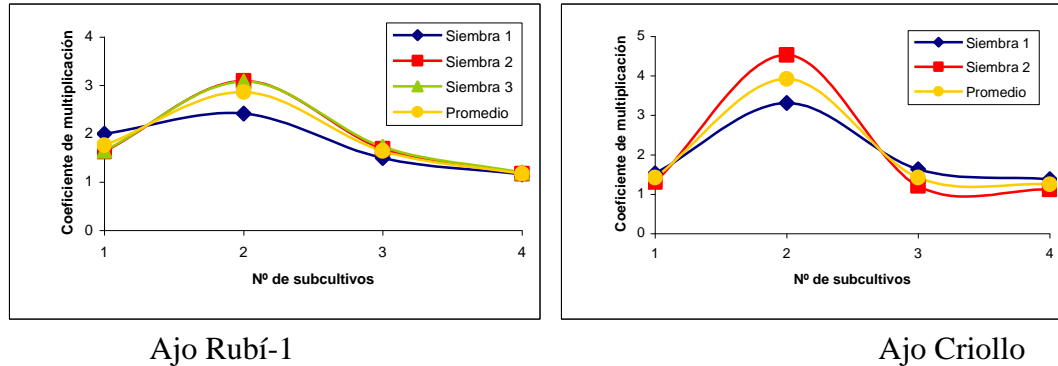


Tabla 25. Comparación del coeficiente de multiplicación promedio presentado en cada subcultivo según la prueba de Tukey por las variedades Rubí-1 y Criollo

Variedad	Subcultivo	Coeficiente
Criollo*	1	1,42 b
	2	3,92 a
	3	1,42 b
	4	1,25 b
	Promedio	2,00
Rubí-1**	1	1,76 b
	2	2,86 a
	3	1,64 b
	4	1,17 c
	Promedio	1,81

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

* Variable que presenta diferencias significativas.

** Variable que presenta diferencias altamente significativas.

Aunque la respuesta de ajo criollo para el coeficiente promedio presentado teniendo en cuenta todos los subcultivos fue mejor, estadísticamente no existen diferencias significativas (Véase Anexo C, Cuadro 30) entre las variedades en la etapa de multiplicación. En concordancia con Alvarado (2001) quien reportó que la capacidad de multiplicación de las variedades Chino, California y Perla no presentan diferencias estadísticas aun cuando la variedad California presentó el mayor número de brotes/explante (12.57), seguido por la variedad Chino y Perla (9.14 y 10.54, respectivamente).

De acuerdo con los resultados es conveniente someter los explantes al segundo o inclusive hasta el tercer subcultivo, para obtener la mayor cantidad de plántulas posibles de ajo Criollo y Rubí-1, logrando la formación de algunos microbulbillos y no perder durante los siguientes subcultivos material vegetal debido a la disminución del coeficiente de multiplicación. La FAO (1991) manifiesta que luego de 45 días en cultivo, los explantes desarrollan brotes (3 en promedio) que son subcultivados cada 30 días, sin embargo, sugiere no realizar más de 3 repiques debido a la disminución en la tasa de multiplicación en los repiques sucesivos posteriores. Sin embargo, Conci (2004) indica que la tasa de multiplicación varía con el número de repiques en el medio de multiplicación, siendo baja en los primeros y aumentando a partir del segundo o tercer repique a medio fresco, como vemos en los resultados para las variedades de interés el comportamiento se ajusta a las indicaciones de la FAO (1991).

En cuanto al tiempo necesario entre cada subcultivo, se establecen 6 semanas como las indicadas; Moriconi (1991) manifiesta que la tasa de multiplicación del ajo depende de las características del clon, siendo muy variables pero llegando de 7 a 8 plántulas en 6 semanas. Para Conci (2004) cada 6 a 8 semanas es posible obtener una tasa de multiplicación que varía entre 2 y 6 brotes/explante, dependiendo del cultivar y del tiempo de permanencia bajo las condiciones “in vitro”. Burba (1992) sugiere realizar los repiques (subcultivos) entre 3 a 6 semanas para evitar la desecación del medio.

Se establece para la etapa de multiplicación que el tratamiento 37 es aquel que permite la obtención de la mayor cantidad de brotes por explante para las dos variedades, así como un mejor desarrollo y crecimiento de los explantes, siendo durante el subcultivo 2 que se logra la mejor tasa de multiplicación y realizando los subcultivos cada 6 semanas.

2.3.1 Ecuación general de producción. Una vez establecido los coeficientes de multiplicación y el número de subcultivos adecuados para cada variedad se puede plantear la ecuación de producción de los genotipos para proyectar el proceso a escala productiva. La producción para cada una de las variedades a partir de 1000 materiales “in vitro”, dada la ecuación general de producción (Aragón, 1995):

$$P = MI \{ CM [1 - (\%R / 100)] \} Np$$

Donde:

P = Producción a obtener.

CM = Coeficiente de multiplicación

MI = Material inicial “in vitro” disponible.

Np = Número de subcultivos.

%R =Porcentaje de rechazo planificado.

Producción para el coeficiente de multiplicación ajo criollo, donde el CM es igual a 2:

$$P = 1000 \{ 2 [1 - (5 / 100)] \}^4$$

P = 13.032 plántulas

Producción para el coeficiente de multiplicación ajo Rubí-1, donde el CM es igual a 1.81:

$$P = 1000 \{ 1.81 [1 - (5 / 100)] \}^4$$

P = 8.741 plántulas

2.4 FASE III: ETAPA DE MICROBULBIFICACIÓN

El objetivo de esta etapa es la producción de plántulas de ajo con órganos de reserva (microbulbillos) para reducir las dificultades presentadas durante la fase de endurecimiento. Se evaluó el diámetro ecuatorial, tamaño de los microbulbillos, el número de raíces y el tamaño de las plántulas para los 4 tratamientos de sacarosa.

A través del análisis de varianza de la variable Diámetro Ecuatorial se establecieron para las dos variedades de estudio (Véase Anexo C, Cuadros 31 y 32) diferencias altamente significativas del tratamiento 42 (90g/l) respecto a los tratamientos 39 y 40 (40 y 50g/l, respectivamente), siendo estadísticamente igual al tratamiento 41 (60g/l). La variedad Criollo presenta un mayor diámetro ecuatorial del microbulbillo desarrollado (8.71).

Los resultados coinciden con los de Mújica y Mogollón (2004) quienes manifiestan que la microbulbificación es afectada significativamente por la sacarosa, aumentando al incrementarse la concentración de la fuente de carbono (Véase Tabla 26). Mújica y Mogollón (2004) reportan que según Yamagishi, 1998 la hidrolización extracelular de la sacarosa en glucosa y celulosa gracias a la enzima ácido invertasa secretada por el tejido de los microbulbos al medio de cultivo favorece un aumento en el crecimiento y desarrollo celular.

Tabla 26. Comportamiento de las variables en la etapa de microbulbificación de ajo criollo

Tratamiento	Ajo Rubí-1			Ajo Criollo		
	Diámetro ecuatorial** (mm)	Tamaño plántula (cm)	Raíces	Diámetro ecuatorial** (mm)	Tamaño plántula* (cm)	Raíces
39 (40g/l)	1,30 c	10,57 a	5,4 a	1,71 c	10,66 b	5,4 a
40 (50g/l)	3,60 b	10,59 a	5,5 a	4,20 b	11,38 ab	5,5 a
41 (60g/l)	4,70 ab	10,31 a	5,7 a	7,75 a	12,12 a	6,6 a
42 (90g/l)	5,70 a	10,23 a	6,6 a	8,71 a	12,40 a	5,7 a

Medias con letras diferentes muestran diferencias para $p < 0.05$.

** Variable que presenta diferencias altamente significativas.

Quezada (1998) afirma que debido a la no existencia de diferencias estadísticamente significativas para los reguladores de crecimiento utilizados para la microbulbificación en su investigación, probablemente la formación de los bulbos se dio por la elevada concentración de sacarosa (50g/l) que aumentó el estrés hídrico, así como el potencial osmótico del medio del cultivo, causando en las células estrés fisiológico que lleva a la inducción de microbulbificación, enmascarando la acción del ácido jasmónico (JA). Kim et al (2003) reporta que las concentraciones altas de sacarosa contribuyen a aumentar la producción de bulbos en las plántulas de ajo, considerando óptimo para el desarrollo de bulbos el medio suplementado con sacarosa al 11%, obteniendo explantes con una masa fresca de 5128 mg y 30.8 bulbos por explante.

Moriconi (1991), Quezada (1998) Burba (1992) y Alvarado (2001) coinciden al manifestar que el tamaño de los microbulbillos puede establecerse indistintamente por su diámetro transversal o peso unitario, debido a que existe una correlación exponencial muy alta entre ambos parámetros, haciendo indiferente su uso para clasificarlos. Sin embargo, Burba (1992) sugiere clasificarlos por diámetro ya que se hace más fácil la separación mecánica del material vegetal. Esta correlación no se demuestra en la presente investigación debido a la credibilidad brindada por los autores anteriores y a que la formación de plántulas con microbulbillos hace difícil establecer el peso real de bulbo debido a la fuerza que las estructuras foliares puedan ejercer al momento de la medición de dicho parámetro. Por ello, la variable peso de microbulbillos propuesta inicialmente no se evaluó y se cambió por la variable diámetro ecuatorial.

Para la variable tamaño de la plántula no existen diferencias significativas entre tratamientos para la variedad Rubí-1, pero el tratamiento 40 presentó la mejor media de crecimiento, aunque los promedios presentados por los tratamientos 41 y 42 fueron los menores, estos se consideran adecuados para la etapa; en cuanto al número de raíces

desarrollados el tratamiento 42 sin presentar diferencias significativas ante los otros tratamientos alcanzó 6.6 raíces por explante.

Para la variedad Criollo existen diferencias significativas del tratamiento 39 respecto a los tratamientos 41 y 42 en la variable tamaño de la plántula, los cuales presentaron mayor crecimiento promedio de las plántulas, aún cuando el desarrollo alcanzado en todos los tratamientos es adecuado, indicando que sin el uso de hormonas durante esta etapa los explantes se desarrollan adecuadamente, debido a los niveles hormonales endógenos o a su adaptación a las condiciones “in vitro”.

La variable Raíces no presentó diferencias estadísticas, sin embargo, el Tratamiento 41 desarrolló el mayor promedio de raíces y de acuerdo a las características de crecimiento presentado se consideran favorables para la etapa de endurecimiento. La evaluación de las variables Raíces y Tamaño de la Plántula, revisten importancia ya que a la fase de endurecimiento serán llevadas como material inicial plántulas con microbulbillo, las cuales con buen desarrollo radicular y vigor se adaptarán presentando mayores porcentajes de supervivencia que una plántula sin microbulbillo.

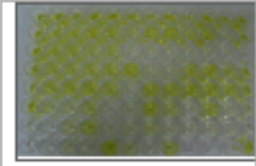
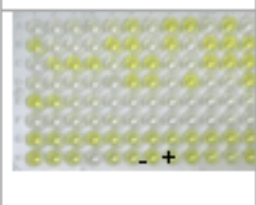
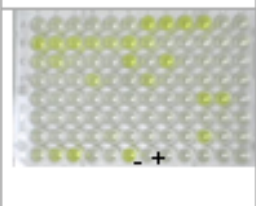
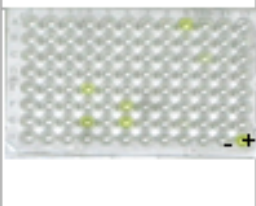

La siembra de estas plántulas brindan respecto a la siembra de microbulbillos la ventaja de un aprovechamiento inmediato del material vegetal “in vitro” para su siembra “ex vitro” en condiciones de invernadero sin tener que esperar a que los microbulbillos sean sometidos a un curado y a que cumplan el periodo dormancia, lo cual permite ahorrar tiempo garantizando el prendimiento del material en condiciones de invernadero. Izquierdo (2000) manifiesta que los microbulbillos son superiores a las vitroplantas alcanzando 95.35 a 99.40% de sobrevivencia al sembrarse “ex vitro” en zeolita y M.O (1:3). Kim et al (2003) afirma que el desarrollo de bulbos puede contribuir a la exitosa aclimatización de los propágulos “in vitro” en condiciones “ex vitro”

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que los tratamientos 41 y 42 fueron los que mejor se comportaron durante la evaluación de la etapa, siendo estadísticamente iguales para todas las variables. Se establece entonces el tratamiento 41 como el indicado para la microbulbificación de ajo Rubí-1 y Criollo debido a que además de ser estadísticamente igual al tratamiento 42 permite un ahorro significativo económicamente (33.33%) de sacarosa, reduciendo el consumo de esta materia prima y permitiendo el logro de material con buenas características de desarrollo para su adaptación “ex vitro”. Se considera que una duración de 6 semanas del cultivo en esta etapa son las indicadas para alcanzar estos resultados.

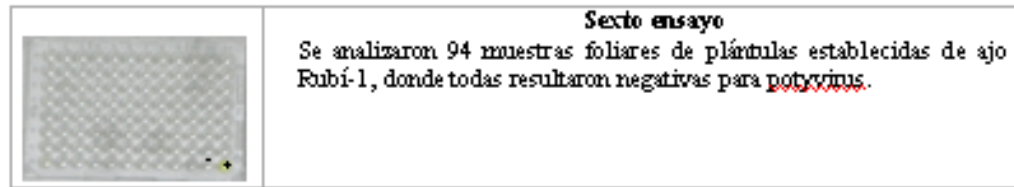
2.5 FASE IV: INDEXACIÓN FITOSANITARIA DE LAS PLÁNTULAS ESTABLECIDAS A Potyvirus MEDIANTE ELISA

Con el análisis ELISA para *Potyvirus* se pretendió en primer lugar conocer el estado fitosanitario del material de partida, y en segundo lugar establecer el porcentaje de efectividad de la técnica de cultivo “in vitro” de meristemos para erradicar el agente viral de los tejidos vegetales, garantizando un proceso de producción de semilla limpia de ajo variedad Rubí-1 y Criollo a través de la micropropagación. Se realizaron 6 montajes analizándose bulbos (hoja de almacenamiento), follaje de plantas de un cultivo en campo y follaje de plántulas de ajo “in vitro” (Véase Figura 8).

Figura 8. Ensayos ELISA's para Potyvirus en ajo Criollo y Rubí-1

	<p>Primer ensayo</p> <p>Se analizaron 10 muestras foliares y 10 de bulbos de ajo criollo y Rubí-1 respectivamente, resultando las 40 muestras positivas a <i>Potyvirus</i>. Se analizaron, además 54 muestras de hojas de plántulas “in vitro” de ajo criollo presentándose 13 muestras positivas para <i>Potyvirus</i>.</p>
	<p>Segundo ensayo</p> <p>Se analizaron 66 muestras hojas de plántulas “in vitro” de ajo criollo presentándose 28 muestras positivas para <i>Potyvirus</i>. Se analizaron 28 muestras de hojas de plántulas “in vitro” de ajo Rubí-1 presentándose 20 muestras positivas para <i>Potyvirus</i>.</p>
	<p>Tercer ensayo</p> <p>Se analizaron 92 muestras hojas de plántulas “in vitro” de ajo Rubí-1 presentándose 26 muestras positivas para <i>Potyvirus</i>.</p>
	<p>Cuarto ensayo</p> <p>Se analizaron 94 muestras foliares de plántulas establecidas de ajo Rubí - 1 presentándose un total de 7 muestras positivas para <i>Potyvirus</i>. Las plántulas positivas fueron descartadas, garantizando la obtención de semilla limpia a lo largo del proceso de producción de ajo Rubí-1 a través de la micropropagación “in vitro”.</p>
	<p>Quinto ensayo</p> <p>Se analizaron 94 muestras foliares de plántulas establecidas de ajo Rubí-1, donde todas resultaron negativas para <i>Potyvirus</i>.</p>

Continuación Figura 8. Ensayos ELISA's para *Potyvirus* en ajo Criollo y Rubí-1



Como se puede observar en la Tabla 27, la semilla de ajo analizada tanto para la variedad Rubí-1 como para la variedad Criollo se encontró infectada con *Potyvirus* en un 100%. Alvarado (2001) analizó grelos de material donante de ajo Chino, California y Perla detectando el 57.29, 70.83 y 75% de los materiales introducidos infectados por *Potyvirus*. Conci (2004) refiere que el virus más importante del complejo debido a los graves daños que causa en la producción es el *Potyvirus* OYDV, el cual se ha detectado en niveles de infección del 52% en plantas provenientes de Europa, del 86% de Asia y entre el 33 y 100% en las áreas productoras de Argentina.

Tabla 27. Evaluación fitosanitaria a *Potyvirus* en diferentes muestras de ajo Rubí-1 y criollo.

Variedad	Material analizado	Muestras	+	-	% Infectados	% Saneados
Rubí-1	Muestras foliares	10	10	0	100%	N.D.
	Muestras bulbos	10	10	0	100%	N.D.
	Muestras foliares cultivo "in vitro"	402	53	349	N.D.	86.82
Criollo	Muestras foliares Ajo criollo	10	10	0	100%	N.D.
	Muestras bulbos	10	10	0	100%	N.D.
	Muestras foliares cultivo "in vitro"	120	41	79	N.D.	65.83

N.D: No se determinó

Los resultados obtenidos al analizar la hoja de almacenamiento de las variedades no son concluyentes debido a que la coloración de los pozos analizados fue de menor intensidad que la del control positivo permitiendo una interpretación errada como falso positivo, ya que su lectura se realizó de manera visual, no con el uso del lector de densidad óptica indicado para este análisis. Por lo tanto, implementar el análisis fitosanitario de este tipo de tejido requiere de estudios más precisos así como de una evaluación de su utilidad.

Según la Tabla 28, los porcentajes de saneamiento en el material de ajo Rubí-1 analizado fue de 81.03%, alcanzándose un aumento gradual e importante en el porcentaje de saneamiento en los 3 últimos ensayos con más de 90% de eliminación del virus e inclusive llegando al 100% de su erradicación como se presentó en los ensayos quinto y sexto.

De la variedad criollo se logró un 65.83% de saneamiento total. Según lo cual se puede decir que se establecieron plántulas de ajo Rubí-1 y Criollo negativas a *Potyvirus* mediante ELISA indirecto, las cuales se propagaron, aquellas que mostraron presencia de *Potyvirus* se desecharon del proceso productivo.

Tabla 28. Ensayos ELISA's para Potyvirus en ajo Criollo y Rubí-1

Ensayos	Ajo Rubí-1				Ajo Criollo			
	Muestras	+	-	% Saneamiento	Muestras	+	-	% Saneamiento
Primero	-	-	-	-	54	13	41	75,93
Segundo	28	20	8	28,57	66	28	38	57,58
Tercer	92	26	66	71,74	-	-	-	-
Cuarto	94	7	87	92,55	-	-	-	-
Quinto	94	0	94	100,00	-	-	-	-
Sexto	94	0	94	100,00	-	-	-	-
Total	402	53	349	86.82	120	41	79	65,83

Conci (2004) manifiesta que el proceso de liberación de virus a través del cultivo de meristemas no es 100% eficiente siendo necesario el análisis para cada uno de los virus que permitan detectar cuáles han sido eliminados y que plantas están realmente libres de virus, y debido a que en las plantas están “in vitro” los virus se encuentran en muy bajas concentraciones, es importante utilizar métodos de diagnóstico de alta sensibilidad e incluso utilizar técnicas combinadas de serología y microscopía. Sugiere además la evaluación periódica de los materiales llevados a casa malla o a campo mediante ELISA hasta obtener las cantidades suficientes para iniciar una producción comercial de ajo.

2.6 COSTOS PARA LA PRODUCCION DE PLANTULAS “in vitro” DE AJO RUBÍ-1 Y CRIOLLO INDEXADAS A Potyvirus

2.6.1 Costos de los insumos requeridos en cada etapa de producción. Los costos de los insumos para las etapas de establecimiento, multiplicación y microbulbificación se elevan debido al precio del gelificante, alcanzando más del 50% del costo de los insumos. La etapa de establecimiento presenta unos costos más elevados debido a la aplicación del análisis fitodiagnóstico, una vez sea posible disponer de semilla libre de virus para los procesos de introducción los costos por insumos en esta etapa disminuirán notablemente. Los costos de la etapa preparativa, presenta estos costos debido al precio de la semilla (Véase Tabla 29).

Tabla 29. Costos de los insumos en las etapas de producción “in vitro” de ajo Rubí -1 y Criollo indexadas a Potyvirus

Etapa	Reactivos	Costo por litro de solución (\$)	Costo por etapa (\$)	Costo producción 1000 plántulas (\$)	Valor unitario de plántula (\$)
Preparativa 200 Exp/l	Desinfectantes	4.197,91	8.395,83		
	Material donante		8.800,00		
			17.195,80	85.979,12	85,97
Establecimiento 200 Exp/l	Sales MS macro	1.100,15		5.500,73	
	Sales MS micro	19,28		96,40	
	Vitaminas	424,50		2.122,48	
	Gelificante	2.762,50		13.812,50	
	Sacarosa	76,29		381,47	
	Reguladores	11,56		57,79	
				4.394,27	21.971,36
	Diagnóstico		661.200,00*	3'306.000,00	3.306
			665.594,27	3'327.971,36	3.327,97
Multiplificación 250 Exp/l	Sales MS macro	1.100,15		4.400,58	
	Sales MS micro	19,28		77,12	
	Vitaminas	929,30		3.717,18	
	Gelificante	2.762,50		11.050,00	
	Sacarosa	76,29		305,18	
	Reguladores	0,28		1,13	
				4.887,80	19.551,19
	Nº subcultivos		4		
			19.551,19	78.204,77	78,20
Microbulbificación 250 Exp/l	Sales macro	1.100,15		4.400,58	
	Sales micro	19,28		77,12	
	Vitaminas	929,30		3.717,18	
	Gelificante	2.762,50		11.050,00	
	Sacarosa	152,59		610,35	
			4.963,81	19.855,24	19,85

* Costo para 200 muestras

Los costos no incluyen mano de obra, materiales directos o gastos indirectos

Para determinar un costo estimado de la semilla para cada variedad se tendrá en cuenta el coeficiente de multiplicación presentado por cada una y los costos de los insumos para cada una de las etapas del proceso productivo (Véase Tabla 30).

Tabla 30. Costos de los insumos de la semilla “in vitro” de las variedades de ajo Rubí -1 y Criollo indexadas a Potyvirus

Variedad	Ajo Rubí – 1		Ajo Criollo	
Coefficiente de Multiplicación	1.81		2	
Etapa	# Explantes	\$ Total	# Explantes	\$ Total
Preparativa	1	85.97	1	85.97
Establecimiento	1	3327.97	1	3327.97
Multiplicación	13	1016.6	8.7	680.34
Microbulbificación	13	258.05	8.7	172.69
Total	13	4688.59	8.7	4266.97
Costo/Plántula indexada		\$ 360.66		\$ 490.97
Costo/plántula sin indexar		\$ 206.02		

Podemos observar que, debido a los coeficientes de multiplicación que maneja cada variedad, la producción de plántulas de ajo Criollo teniendo en cuenta los costos de los insumos, son más bajos que para ajo Rubí-1 en un 26.54%. Así mismo, que si se partiera de material limpio para el proceso de producción “in vitro”, el costo de los insumos para cada plántula de cualquiera de las dos variedades sería de \$206.02. Es necesario determinar los costos indirectos, por mano de obra y materiales directos para establecer el precio real de las plántulas obtenidas durante el desarrollo del proceso.

Este proceso productivo permitirá la adecuación a nivel de invernadero, casa de malla y campo de lotes de producción de semilla de ajo Rubí-1 y Criollo libre de patógenos, indexada a *Potyvirus* mediante ELISA indirecto, los cuales proveerán materiales con calidad genética y sanitaria para el proceso de producción “in vitro”, disminuyendo los gastos que conlleva el método diagnóstico e incluso permitiendo el empleo explantes de mayor tamaño sin correr el riesgo de introducir material con virus y aumentando los porcentajes de regeneración y viabilidad de los mismos. La implementación de estas técnicas es una alternativa que brindará eficiencia y eficacia para el cultivo de ajo favoreciendo la agricultura nacional y el desarrollo del cultivo en vista a los nuevos tratados comerciales.

3. CONCLUSIONES

El establecimiento del ciclo productivo de materiales de ajo de las variedades Rubí-1 y Criollo mediante la técnica de cultivo “in vitro” de meristemos permitió obtener semilla de calidad fitosanitaria, indexada como libre de *Potivirus* a través de la técnica ELISA indirecto (Véase Anexo D).

Los genotipos estudiados manifestaron un comportamiento similar ante los tratamientos de cada una de las etapas, y aun cuando no presentaran estadísticamente la misma respuesta ante las variables evaluadas, hubo la tendencia a expresar los mejores resultados en los mismos tratamientos, favoreciendo la unificación del proceso productivo.

El uso de hipoclorito de Sodio al 5% por 10 minutos más hipoclorito de calcio a una concentración del 1% por 10 minutos, permitió lograr porcentajes de desinfección adecuados para el proceso de producción “in vitro”, así como los mayores porcentajes de viabilidad de los explantes. La previa determinación de un protocolo de desinfección adecuado garantiza la obtención de buenos resultados durante la etapa de establecimiento evitando pérdidas por contaminación o afección de los explantes a los desinfectantes.

Controlar las condiciones de cultivo a las que se someten los explantes tales como humedad relativa, temperatura, calidad y concentración del gelificante, contenedor seleccionado y tipo de sellado del mismo ayuda a reducir la incidencia del fenómeno de vitrificación en los materiales introducidos debido a la susceptibilidad que presenta la familia Alliáceae ante este desorden fisiológico.

El desarrollo de los explantes sometidos a la etapa de establecimiento es independiente del tamaño de los materiales iniciales, debido a que este se da por la acción que ejercen sobre ellos los componentes del medio de cultivo y es una respuesta que tiene una estrecha relación con el genotipo.

Los tratamientos 11, 12, 2 y 4 para la variedad Criollo y los tratamientos 2, 7, 10 y 13 para la variedad Rubí-11, permitieron el establecimiento adecuado de los explantes alcanzando una longitud igual o superior a 1.5cm durante un período de 3 a 4 semanas.

El tratamiento seleccionado para la etapa de establecimiento de las dos variedades de estudio que ayuda a alcanzar un adecuado desarrollo de los explantes y permite un

comportamiento mejor de los mismos en la etapa de multiplicación es el tratamiento 2 suplementado con AIA 0.1mg/l y KIN 0.1mg/l; el tratamiento enriquecido con 0.5mg/l de 2ip y 0.1mg/l ANA es el que mayor desarrollo de brotes por explante permite en su interacción con explantes sometidos al tratamiento de establecimiento seleccionado.

El genotipo ajo criollo manifiesta un mejor comportamiento durante el proceso de producción “in vitro”, reflejado en el desarrollo y vigor que presentan los materiales que se producen en las diferentes etapas, así mismo permite la mayor obtención de brotes por explante con un coeficiente de multiplicación de 2 para todo el proceso productivo, y llegando a obtener en el subcultivo 2 hasta 3.92 brotes por explante.

El genotipo de ajo Rubí-1 alcanza una producción de 1.81 brotes por explante durante el proceso de producción, presentando durante el segundo subcultivo la mayor cantidad de explantes (2.86).

El tamaño del microbulbillo presenta ante la concentración de sacarosa una relación directa, donde a mayor concentración de sacarosa mayor tamaño del microbulbillo.

El uso de 60g/l de sacarosa permite un buen desarrollo de los microbulbillos, de las estructuras foliares y radicales.

La obtención de plántulas con el desarrollo de microbulbillos y estructuras radicales permite una mejor respuesta de adaptación a condiciones “ex vitro”, favoreciendo una mayor sobrevivencia de las plántulas llevadas a condiciones de invernadero.

El cultivo de meristemas “in vitro” permitió según la técnica de diagnóstico ELISA indirecto erradicar el agente viral (*Potyvirus*) de las plántulas establecidas de ajo Rubí-1 en 86.82% y de ajo criollo en un 65.83%.

Los costos de producción de la semilla pre-básica de ajo Rubí-1 y Criollo limpia de *Potyvirus* mediante cultivo de meristemas, se consideran adecuados para el proceso “in vitro”. Una vez las plántulas son sometidas al proceso de endurecimiento y de propagación “ex vitro” bajo condiciones de invernadero y de casa de malla es posible obtener volúmenes de semillas básica a un costo competitivo y con valor agregado al brindar a los productores una semilla con calidad genética y sanitaria, así como las ventajas que a mediano plazo puede generar con el aumento de los rendimientos de producción y la disminución de las pérdidas por infestación del cultivo, aunado con la proyección de la especie en los tratados de comercialización internacional.

4. RECOMENDACIONES

Implementar los diferentes análisis que permitan determinar la calidad de la semilla que ingresa al proceso de producción “in vitro” como son el análisis físico, fisiológico, morfológico y de pureza varietal, el análisis micológico, y el análisis para nematodos, eriofidos y ácaros.

Aplicar al material establecido “in vitro” pruebas diagnosticas que determinen la eliminación de otros virus como los carlavirus, para ofertar semilla libre del complejo viral Potyvirus-Carlavirus, debido a que el saneamiento de un tipo de virus no significa la erradicación de todos los virus existentes en el material analizado.

Favorecer en condiciones “in vitro” el proceso de microbulbificación, sometiendo los microbulbillos obtenidos al secado, curado y período de dormición para evaluar su comportamiento “ex vitro” frente a plántulas con microbulbillos.

Adecuar un lote a nivel de casa malla o campo con la semilla de ajo obtenida “in vitro” e indexada para disponer de materiales donantes de calidad fitosanitaria y estabilidad genética en los proyectos programados las variedades investigadas, especialmente de ajo Rubí-1.

Evaluar las plantas llevadas a invernadero o a campo, adecuando el sistema de producción de semillas limpias de ajo Rubí-1 y Criollo al esquema propuesto para la producción de semillas libres de virus.

BIBLIOGRAFIA

ACEVEDO NIETO, Rodolfo Alexis. Control integrado de la pudrición blanca del Ajo (*Sclerotium cepivorum*, Berk). Maracay, 1992 En: Fac. Agron. 8:120-121 [citado en marzo de 2005]. Disponible en internet: <URL:http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagro/v18_11/v181a090.html>

AGDIA. Indirect ELISA, alkaline phosphatase label. [citado en marzo de 2005]. Disponible en internet: <URL:http://www.agdia.com/cgi_bin/catalog.cgi?m23.1>

AGENOR PAVAN, Marcelo. Viroses em Alho Nobre: Identificação, Estabelecimento de Métodos Eficientes para Obtenção de Plantas Livres de Vírus, Seleção de Clones Assintomático. Sao Paulo, 1998 [citado en mayo de 2005]. Disponible en internet: <URL:<http://www.horticultura.com.br/biblioteca/biblmot.asp?id=TESE0003&Categoria=Disserta%20C3%A7%C3%B5es%20&%20Teses>>

AGRIOS, G. N. Fitopatología. México: LIMUSA, 2005. 2ed. 850 p.

ALVARADO R., Miguel, MORENO, Alejandra y MARTÍNEZ P. Mauro M. Obtención de semilla de Ajo (*Allium sativum*) libre de patógenos. México, 2001 [citado en Junio de 2005]. Disponible en internet: <URL:<http://www.ciu.reduaz.mx/investigacion/Agropecuarias/WORD/ap02-002.doc>>

BHOJWANI, S.S. In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. En: Sci. Hort. Vol. 13, No. 1 (1980); 86 p.

BRUNA, Alicia; MUÑOZ, Carlos y ESCAFF, Moisés. Obtención de Ajos libres de virus mediante termoterapia y cultivo “in vitro”. Santiago de Chile. En: Simiente. Vol. 63, No. 1 (1993): 154 p.

BURBA, José. Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización de Ajo, cebolla y tomate. Santiago de Chile: FAO, 1992. 238 p.

CLIMACO HIO, Juan. Bogotá, 27 de Abril de 2005. [Entrevista personal]

CONCI, Vilma. Obtención de plantas libres de virus. Buenos Aires, 2003 [citado en abril de 2006]. Disponible en internet: <URL:http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte8_cap6.pdf#search=%22libre%20virus%20plantas%20ajo%20conci%20VIII%22>

CONCI, Vilma, CANAVELLI, Ana, LUNELLO, PEDRO y DI RIENZO, J. Yield losses associated with virus-infected garlic plant during five successive years. Buenos Aires, 2003 [citado en abril de 2006]. Disponible en internet: <URL:http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa4066/is_200312/ai_n9316380>

CONCI, Vilma, CAFRUNE, Eva; LUNELLO, Pablo, NOME, Sergio y PEROTTO, Cecilia. Producción de plantas de Ajo libres de virus. Buenos Aires: INTA, 2004. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. [citado en mayo de 2006]. Disponible en internet: <URL:http://www.argenbio.org/h/biblioteca/libropre.php?link=30_VIII_6.pdf>

CONCI, Vilma, CAFRUNE, Eva, LUNELLO, Pablo, NOME, Sergio, BRACAMONTE, Roxana, ALOCHIS, Patricia y PEROTTO, Cecilia. Incidencia de los virus en la producción de ajo y su control. Buenos Aires, 2004 [citado en mayo de 2006]. Disponible en internet: <URL:<http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/horticola/ajo03.pdf#search=%22incidencia%20virus%20ajo%20conci%22>>

CORPOICA - COLCIENCIAS. Establecimiento de un modelo de producción de semilla limpia de ajo en la variedad rubí-1 y su evaluación a nivel de agricultor como fomento del cultivo en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Bogotá, 2004. 21 p.

CUESTA Hoyos, Carlos Alberto. Producción de plantas “in vitro” de Ajo (*Allium sativum* L) de la variedad Rubí-1 bajo condiciones controladas de laboratorio. Mosquera: CORPOICA, 2004. 28 p.

CHAPARRO P., Catalina A. Avances en la estandarización de la metodología para el cultivo “in vitro” de *Allium sativum* var. Rubí –1. Mosquera: CORPOICA, 1998. 29 p.

FAO. Manual de intercambio y manejo de germoplasma “in vitro” de Ajo. Santiago: INIA, 1989. 12 p.

FAO. Manual de Intercambio y propagación de germoplasma de Ajo a través de microbulbillos. Santiago: INIA, 1991. 35 p.

FAOSTAT. Datos agrícolas de FAOSTAT. 2004 [citado en julio de 2006]. Disponible en internet:

<URL:<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=ES>>

GARCIA, Eva y VARGAS, Teresa Edith. Micropropagación clonal masiva de variedades de ajo (*Allium sativum*), con fines comerciales. 2000. En: Memorias del X Congreso Italo Iberoamericano de Etnomedicina: 356 p.

GOMEZ, Olimpia. Desinfección y saneamiento de la semilla de ajo para su establecimiento in Vitro. INRA, 1992. 4 p.

HERNANDEZ, Claudia y MANCIPE, Marisol. Evaluación de técnicas de termoterapia y cultivo de meristemas para la erradicación de enfermedades virales en Ajo (*Allium sativum* L.). Bogotá, 1997, 73 p. Trabajo de grado (Licenciado en Biología) Universidad Distrital “Francisco José de Caldas”. Facultad de Ciencia y Educación. Departamento de Biología.

HERNANDEZ, R. Et al. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. con optimización del diagnóstico por μ MELISA. Centro Agrícola 24 (1): 66 p.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HORTICOLAS “LILIANA DIMITROVA”. Obtención de semillas de Ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. En: Temas, Septiembre - Diciembre de 2001[citado en marzo de 2005]. Disponible en internet: <URL:<http://mixteco.utm.mx/temas-docs/nfnotas15R2.pdf>>

KAMSTAITYTE, Danguole y STANYNS, Vidmantas. Micropropagation of onion (*Allium cepa* L.). 2004. En: Acta Universitatis Latviensis, Biology. 676: 176 p.

MARTÍNEZ R., Paulina. Obtención de plantas libres de patógenos mediante el cultivo de tejido meristemático y termoterapia. Bogotá, 1987. En: ICA 22(4): 248 p.

MORICONI, D.N.; V.C.CONCI y S.F.NOME. Rapid Multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. Buenos Aires, 1990. En: Phyton-International Journal of Experimental Botany 51 (2): 151 p.

MÚJICA, Henry y MOGOLLÓN, Norca. Bulbificación “in vitro” del Ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. Barquisimeto, 2004. En: Bioagro 16 (1): 60 p.

OSORIO, Jaime. Generalidades de la producción de hortalizas en Colombia. En: Primer Curso Nacional de Hortalizas de Clima Frío. Mosquera: ICA, 1992. 89 p.

PAPPU, H. R.; HELLIER, B. C. y DUGAN, F. M. First report of Onion yellow dwarf virus, Leek yellow stripe virus and Garlic common latent virus in Garlic in Washington State. Washington: Washington State University, Noviembre de 2004. En: Plant Disease 89: 205.

PÉREZ, L M. La biotecnología como herramienta en el control de fitopatógenos. Santiago de Chile, 1993. En: II Congreso Nacional de Fitopatología. En: Simiente. 63(1): 63 p.

PEREZ PONCE, J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998. 390 p

PINZON RAMIREZ, Hernán. Rubí-1: primera variedad mejorada de Ajo en Colombia. Bogotá: Produmedios, 1999. 18 p.

QUEZADA, J. A., ASCARRUNZ, M. E. y SILVA, M. A. Evaluación de la respuesta de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) a la variación de medios y reguladores de crecimiento, en el proceso de microbulbificación in Vitro. La Paz, 2001 [citado en mayo de 2005]. Disponible en internet:
<URL:http://redbio.org/portal/encuentro/enc_2001/posters/01/posterpdf/01-030/htm>

RINCÓN, Alvaro y CIFUENTES, Hugo. Estudio de la propagación “in vitro” de Ajo (*Allium sativum*) como método para mejorar la calidad sanitaria de la semilla. Tesis: Ingeniero Agrónomo. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 1983. 75 p.

ROBLEDO-PAZ, A.; VILLALOBOS-ARÁMBULA, V. M. y JOFRE-GARFIAS, A. E. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. 2000. En: “in vitro” Cellular and Development Biology - Plant. 36 (5): 419 p.

ROCCA, William. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Cali: CIAT, 1987. 359 p.

SISTEMA DE INFORMACION DE PRECIOS DEL SECTOR AGROPECUARIO El mercado del Ajo en Colombia. Bogotá: SIPSA- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2003. Boletín Bimestral de Febrero-Marzo [citado en mayo de 2005]. Disponible en internet: <URL:<http://www.cci.org.co/publicaciones/Sipsa/sipsa52.pdf>>

UNITED STATE DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. Plants database. [citado en junio de 2005] Disponible en internet: <URL:[http://plants.usda.gov/cgi_bin/topics.cgi?earl=plant profile.cgi&symbol=ALSA2](http://plants.usda.gov/cgi_bin/topics.cgi?earl=plant%20profile.cgi&symbol=ALSA2)>

VELLOSOS, Carolina Crochemore y PEGLOW, Karin. Plantas medicinais. EMATER/RS: Porto Alegre, 2003. En: Apendendo a Fazer Melhor. 4: 73 p.

WALKEY, D. G. Production of virus-free Garlic (*Allium sativum* L.) and Shallot (*Allium*) by meristem tip culture. Wellesbourne: National Vegetable Research Station, 1987. En: Journal of horticultural Science 62(2): 220 p.

ANEXOS

Anexo A. Formulación del medio basal para el cultivo “in vitro” de ajo

COMPUESTOS

Macronutrientes

	mg/l
Nitrato de amonio	1650
Nitrato de potasio	1900
Cloruro de calcio.2H ₂ O	440
Sulfato de magnesio.7H ₂ O	370
Fosfato de potasio	400

Micronutrientes

Sulfato de hierro.7H ₂ O	27,8
EDTA sódico.2H ₂ O	37,2
Acido bórico	6,18
Sulfato de manganeso.H ₂ O	16,9
Yoduro de potasio	0,83
Molibdato de sodio.2H ₂ O	0,24
Sulfato de zinc.7H ₂ O	8,6
Cloruro de cobalto. 6H ₂ O	0,024
Sulfato de cobre.5H ₂ O	0,025

Vitaminas y otros

Glicina	2
Tiamina	0,4
Acido nicotínico	0,4
Piridoxina	0,5
Hemisulfato de adenina	80
Myoinositol	100
Phytigel	2200
Sacarosa	30000

Anexo B. Evaluación de bulbos y bulbillos de ajo Criollo y Rubí-1

Bulbo	Ajo Criollo					Ajo Rubí-1			
	Bulbillos	> 2.5cm	4 cm	Peso	Peso/bulbillo	Bulbillos	> 2.5cm	Peso	Peso/bulbillo
1	24	16		27,84	1,74	21	14	22,61	1,62
2	12	9		15,79	1,75	25	18	34,56	1,92
3	20	14		20,44	1,46	17	15	28,22	1,88
4	14	6		11,5	1,92	21	16	26,76	1,67
5	14	11		21,58	1,96	23	18	30,69	1,71
6	16	9		19,85	2,21	27	23	36,05	1,57
7	12	10		17,67	1,77	26	20	38,46	1,92
8	14	8		18,12	2,27	37	16	32,92	2,06
9	19	13		29,45	2,27	39	18	43,48	2,42
10	7	0	7	28,01	4,00	32	24	32,54	1,36
11	15	7		19,08	2,73	36	25	45,4	1,82
12	16	8		19,84	2,48	24	12	32,85	2,74
13	11	6		16,57	2,76	28	22	38,69	1,76
14	22	12		27,2	2,27	21	17	31,36	1,84
15	18	11		31,17	2,83	34	13	19,45	1,50
16	18	12		32,49	2,71	19	11	20,92	1,90
17	17	9		23,3	2,59	27	21	34,53	1,64
18	17	8		21,3	2,66	24	19	38,6	2,03
19	15	9		19,38	2,15	38	24	43,8	1,83
20	13	8		18,46	2,31	17	11	18,98	1,73
21	10	6		16,47	2,75	23	12	16,74	1,40
22	18	11		21,07	1,92	25	18	35,67	1,98
23	34	21		26,53	1,26	33	27	39,26	1,45
24	16	8		11,89	1,49	18	14	32,85	2,35
25	11	6		15,88	2,65	25	19	29,38	1,55
Total	403	238	7	21,24	2,28	660	447	32,19	1,82

Anexo C. Resultados de los análisis estadísticos de las etapas del proceso

Cuadro 1. ANOVA para las siembras de desinfección evaluando el porcentaje de contaminación por Bacteria, de contaminación por Hongo y de contaminación total en ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Contaminación Bacteria		Contaminación Hongo		Contaminación Total	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	7,13608	0,6492	6,58601	0,5304	3,8332	0,8810
Intre grupos	6	15,355		9,32648		29,6321	
Total (Corr.)	8						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 2. ANOVA para las siembras de desinfección evaluando el porcentaje de contaminación por Bacteria, de contaminación por Hongo y de contaminación total en ajo Criollo.

Fuente	GL	Contaminación Bacteria		Contaminación Hongo		Contaminación Total	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	11,5218	0,0724	2,19534	0,6297	3,84308	0,7066
Intre grupos	6	2,74541		4,39068		10,4365	
Total (Corr.)	8						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 3. ANOVA para los tratamientos de desinfección evaluando el porcentaje de contaminación por Bacteria, de contaminación por Hongo y de contaminación total en ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Contaminación Bacteria		Contaminación Hongo		Contaminación Total	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	35,0859	0,0395*	11,5218	0,2963	86,1583	0,0004**
Intre grupos	6	6,03841		7,68121		2,1904	
Total (Corr.)	8						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 4. ANOVA para los tratamientos de desinfección evaluando el porcentaje de contaminación por Bacteria, de contaminación por Hongo y de contaminación total en ajo Criollo.

Fuente	GL	Contaminación Bacteria		Contaminación Hongo		Contaminación Total	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	6,58601	0,2963	7,13114	0,1540	26,9237	0,0128*
Intre grupos	6	4,39068		2,74541		2,74294	
Total (Corr.)	8						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 5. ANOVA para las siembras y los tratamientos de desinfección evaluando el porcentaje de Viabilidad en ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Siembra		Tratamiento	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	1515.11	0.0051**	208.44	0.6957
Intre grupos	6	104.778		540.33	
Total (Corr.)	8				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 6. ANOVA para las siembras y los tratamientos de desinfección evaluando el porcentaje de Viabilidad en ajo Criollo.

Fuente	GL	Siembra		Tratamiento	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	445.44	0.0287*	143.44	0.4684
Intre grupos	6	65.556		166.22	
Total (Corr.)	8				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 7. ANOVA para las siembras y los tratamientos de desinfección evaluando el porcentaje de Vitrificación en ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Siembra		Tratamiento	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	2918.78	0.0009**	208.44	0.8186
Intre grupos	6	103.778		1007.22	
Total (Corr.)	8				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 8. ANOVA para las siembras y los tratamientos de desinfección evaluando el porcentaje de Vitrificación en ajo Criollo.

Fuente	GL	Siembra		Tratamiento	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Entre grupos	2	1354.11	0.0024**	107.44	0.8078
Intre grupos	6	70.2222		485.778	
Total (Corr.)	8				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 9. ANOVA's factoriales de la variable altura de las plántulas establecidas de ajo Rubí-1 y Criollo.

Fuente	GL	Rubí-1		Criollo	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Auxina (A)	1	488.963	0.0000**	37.037	0.0023**
Nivel auxina (B)	2	190.549	0.0005**	167.058	0.0000**
Nivel kinetina (C)	2	242.105	0.0001**	0.57250	0.2347
A*B	2	224.329	0.0001**	116.968	0.0000**
A*C	2	107.829	0.0127*	228.676	0.0032**
B*C	4	177.543	0.0000**	705.958	0.0000**
A*B*C	4	396.675	0.0000**	104.919	0.0321*
RESIDUAL	414	0.24455		0.39357	
TOTAL	431				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 10. Interacciones para la evaluación de las medias de la Altura de las plántulas establecidas en las siembras de ajo Rubí-1.

SIEMBRAS				Siembra 1		Siembra 2		Siembra 3		Promedio	
Fuente				S	Media	S	Media	S	Media	S	Media
INTERACCIONES	AUXINA según NIVAUX	AIA	0,1	n.s	1,77083	n.s	1,55000	n.s	1,47500	**	1,59861
			0,5		1,53333		1,60833		1,48333		1,54167
			1		1,75000		1,52083		1,59583		1,62222
		ANA	0,1		1,50833		1,70417		1,64167		1,61806
			0,5		1,24583		1,50833		1,32500		1,35972
			1		1,17500		1,30417		0,95833		1,14583
	AUXINA según NIVKIN	AIA	0	**	1,75833	n.s	1,62500	**	1,58333	*	1,65556
			0,1		1,98750		1,57917		1,54167		1,70278
			0,5		1,30833		1,47500		1,42917		1,40417
		ANA	0		1,49167		1,60000		1,55417		1,54861
			0,1		1,14167		1,49583		1,23333		1,29028
			0,5		1,29583		1,42083		1,13750		1,28472
	NIVAUX según NIVKIN	0,1	0	**	1,60000	n.s	1,64375	**	1,51875	**	1,58750
			0,1		0,1		1,85000		1,79375		1,71875
		0,1	0,5		1,46875		1,44375		1,43750		1,45000
		0,5	0		1,81250		1,76875		1,76875		1,78333
		0,5	0,1		1,21250		1,30000		1,23125		1,24792
		0,5	0,5		1,14375		1,60625		1,21250		1,32083
		1	0		1,46250		1,42500		1,41875		1,43542
		1	0,1		1,63125		1,51875		1,21250		1,45417
		1	0,5		1,29375		1,29375		1,20000		1,26250
		AUXINA*NIVAUX*NIVKIN					**				**

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 11. Interacciones para la evaluación de las medias de la Altura de las plántulas establecidas en las siembras de ajo Criollo.

SIEMBRAS				Siembra 1		Siembra 2		Siembra 3		Promedio	
Fuente				S	Media	S	Media	S	Media	S	Media
INTERACCIONES	AUXINA según NIVAUX	AIA	0,1	**	2,01667	**	2,15000	**	1,90000	**	2,02222
			0,5		2,00833		2,17917		1,92500		2,03750
			1		2,02917		1,70833		1,80417		1,84722
		ANA	0,1		2,76250		2,28333		2,43750		2,49444
			0,5		1,33750		1,41667		1,73333		1,49583
			1		1,02500		1,56250		1,49583		1,36111
	AUXINA según NIVKIN	AIA	0	n.s	2,15417	n.s	1,94583	**	1,95	**	2,01528
			0,1		2,15000		2,16250		2,04		2,11806
			0,5		1,75000		1,92917		1,64		1,77361
		ANA	0		1,81250		1,54583		1,73		1,69583
			0,1		1,52500		1,80417		2,00		1,77639
			0,5		1,78750		1,91250		1,94		1,87917
NIVAUX según NIVKIN	0,1	0	**	2,05625	**	1,74375	**	1,68	**	1,82708	
		0,1		0,1		2,80000		2,60000		2,71250	2,70417
	0,1	0,5		2,31250		2,30625		2,11250		2,24375	
	0,5	0		2,25000		2,00625		2,18125		2,14583	
	0,5	0,1		1,50625		1,48125		1,81250		1,60000	
	0,5	0,5		1,26250		1,90625		1,49375		1,55417	
	1	0		1,64375		1,48750		1,65000		1,59375	
	1	0,1		1,20625		1,86875		1,53750		1,53750	
1	0,5	1,73125	1,55000	1,76250	1,68125						
AUXINA*NIVAUX*NIVKIN				*		**		**		*	

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 12. ANOVA's factoriales de la variable número de hojas de las plántulas establecidas de ajo Rubí-1 y Criollo.

Fuente	GL	Rubí-1		Criollo	
		Cuadrado medio	P-Valor	Cuadrado medio	P-Valor
Auxina (A)	1	0.45370	0.0503	0.00231	0.9207
Nivel auxina (B)	2	0.07176	0.5442	150.694	0.0017**
Nivel kinetina (C)	2	100.926	0.0002**	0.33333	0.2403
A*B	2	0.23843	0.1333	0.55787	0.0014**
A*C	2	0.34259	0.0556	0.45370	0.1440
B*C	4	0.15162	0.2741	0.84028	0.0066*
A*B*C	4	0.34606	0.0204*	0.23843	0.3949
RESIDUAL	414	545.185		0.23299	
TOTAL	431				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 13. Interacciones para la evaluación de las medias del número de hojas de las plántulas establecidas en las siembras de ajo Rubí-1.

SIEMBRAS				Siembra 1		Siembra 2		Siembra 3		Promedio		
Fuente				S	Media	S	Media	S	Media	S	Media	
INTERACCIONES	AUXINA según NIVAUX	AIA	0,1	n.s	1,25000	n.s	1,16667	n.s	1,25000	n.s	1,22222	
			0,5		1,08333		1,16667		1,12500		1,12500	
			1		1,25000		1,16667		1,16667		1,19444	
		ANA	0,1		1,16667		1,08333		1,12500		1,12500	
			0,5		1,16667		1,16667		1,12500		1,15278	
			1		1,00000		1,08333		1,12500		1,06944	
	AUXINA según NIVKIN	AIA	0	*	1,12500	n.s	1,33333	n.s	1,20833	n.s	1,22222	
			0,1		1,33333		1,08333		1,25000		1,22222	
			0,5		1,12500		1,08333		1,08333		1,09722	
		ANA	0		1,25000		1,20833		1,29167		1,25000	
			0,1		1,04167		1,08333		1,04167		1,05556	
			0,5		1,04167		1,04167		1,04167		1,04167	
	NIVAUX según NIVKIN		0,1	n.s	1,18750	n.s	1,18750	n.s	1,25000	n.s	1,20833	
			0,1		0,1		1,25000		1,18750		1,25000	1,22917
			0,1		0,5		1,18750		1,00000		1,06250	1,08333
			0,5		0		1,18750		1,43750		1,18750	1,27083
			0,5		0,1		1,18750		1,00000		1,12500	1,10417
			0,5		0,5		1,00000		1,06250		1,06250	1,04167
			1		0		1,18750		1,18750		1,31250	1,22917
			1		0,1		1,12500		1,06250		1,06250	1,08333
	1	0,5	1,06250	1,12500	1,06250	1,08333						
	AUXINA*NIVAUX*NIVKIN				*		n.s		n.s		*	

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 14. Interacciones para la evaluación de las medias del número de hojas de las plántulas establecidas en las siembras de ajo Criollo.

SIEMBRAS				Siembra 1		Siembra 2		Siembra 3		Promedio	
Fuente				S	Media	S	Media	S	Media	S	Media
I N T E R A C I O N E S	AUXINA según NIVAUX	AIA	0,1	n.s.	1,29167	n.s.	1,33333	*	1,25000	**	1,29167
			0,5		1,37500		1,37500		1,33333		1,36111
			1		1,25000		1,25000		1,20833		1,23611
		ANA	0,1		1,41667		1,54167		1,62500		1,52778
			0,5		1,29167		1,20833		1,08333		1,19444
			1		1,04167		1,25000		1,25000		1,18056
	AUXINA según NIVKIN	AIA	0	n.s.	1,37500	n.s.	1,45833	n.s.	1,37500	n.s.	1,40278
			0,1		1,33333		1,29167		1,20833		1,27778
			0,5		1,20833		1,20833		1,20833		1,20833
		ANA	0		1,33333		1,25000		1,33333		1,30556
			0,1		1,12500		1,33333		1,33333		1,26389
			0,5		1,29167		1,41667		1,29167		1,33333
	NIVAUX según NIVKIN	0,1	0	n.s.	1,37500	n.s.	1,43750	n.s.	1,37500	**	1,39583
		0,1	0,1		1,37500		1,43750		1,56250		1,45833
		0,1	0,5		1,31250		1,43750		1,37500		1,37500
		0,5	0		1,62500		1,50000		1,37500		1,50000
		0,5	0,1		1,18750		1,18750		1,12500		1,16667
		0,5	0,5		1,18750		1,18750		1,12500		1,16667
		1	0		1,06250		1,12500		1,31250		1,16667
		1	0,1		1,12500		1,31250		1,12500		1,18750
	1	0,5	1,25000	1,31250	1,25000	1,27083					
AUXINA*NIVAUX*NIVKIN				n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 15. ANOVA's factoriales de la variable número de raíces de las plántulas establecidas de ajo Criollo.

Fuente	GL	Número de Raíces	
		Cuadrado medio	P-Valor
Auxina (A)	1	.05787	0.7389
Nivel auxina (B)	2	127.083	0.0882
Nivel kinetina (C)	2	117.361	0.1061
A*B	2	284.954	0.0045**
A*C	2	0.97454	0.1549
B*C	4	0.41319	0.5294
A*B*C	4	0.42245	0.5180
RESIDUAL	414	0.52023	
TOTAL	431		

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 16. Interacciones para la evaluación de las medias del número de raíces de las plántulas establecidas en las siembras de ajo Criollo.

SIEMBRAS			Siembra 1		Siembra 2		Siembra 3		Promedio		
Fuente			S	Media	S	Media	S	Media	S	Media	
I N T E R A C I O N E S	AUXINA según NIVAUX	AIA	0,1	0,208333		0,5		0,333333		0,347222	
			0,5	0,458333		0,5		0,444444			
			1	0,458333		0,54167		0,430556			
		ANA	0,1	0,416667		0,7083		0,638889			
			0,5	0,333333	n.s	0,3333	n.s	0,333333	**	0,333333	
			1								
	AUXINA según NIVKIN	AIA	0	0,5		0,54166		0,583333		0,541667	
			0,1	0,5		0,58333		0,291667		0,458333	
			0,5	0,125		0,416667		0,125		0,222222	
		ANA	0	0,375		0,5		0,416667		0,430556	
			0,1	0,291667	n.s	0,33333	*	0,375	n.s	0,333333	
			0,5	0,208333		0,29167		0,666667		0,388889	
	NIVAUX según NIVKIN	0,1	0	0,1875		0,5625		0,75		0,5	
			0,1	0,1	0,4375		0,75		0,583333		
			0,1	0,5	0,3125		0,5		0,395833		
		0,5	0	0,5625		0,6875		0,5		0,583333	
			0,5	0,1	0,4375	n.s	0,3125	n.s	0,1875	n.s	0,3125
			0,5	0,5	0,1875		0,25		0,375		0,270833
		1	0	0,5625		0,3125		0,25		0,375	
			0,1	0,3125		0,3125		0,25		0,291667	
			0,5	0		0,3125		0,4375		0,25	
	AUXINA*NIVAUX*NIVKIN			n.s		n.s		n.s		n.s	

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 17. ANOVA de las variables altura y número de raíces de las plántulas establecidas de ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Altura		Número de hojas	
		Cuadrado medio	P-valor	Cuadrado medio	P-valor
Auxina	17	2,5385	0,0000 **	0,3393	0,0001* *
Nivel auxina	414	0,2446		0,1178	
Nivel kinetina	431				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 18. ANOVA de las variables altura, número de hojas y de raíces de las plántulas establecidas de ajo Criollo.

Fuente	GL	Altura		Número de hojas		Número de raíces	
		Cuadrado medio	P-valor	Cuadrado medio	P-valor	Cuadrado medio	P-valor
Auxina	17	5,8037	0,0000**	0,7071	0,0001**	0,93750	0,02570*
Nivel auxina	414	0,3936		0,2330		0,52202	
Nivel kinetina	431						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 19. ANOVA's factoriales de las variables altura, número de hojas y de raíces en el primer subcultivo del primer ensayo de multiplicación de plántulas de ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Altura		Hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Auxina / Kinetina (A)	2	30,7226	0,0001**	0,385417	0,4752	0,59375	0,3111
Tratamiento introducción (B)	3	11,649	0,0106*	2,09375	0,0094**	1,03819	0,1103
AB	6	2,81649	0,4566	1,55208	0,0100**	0,0798611	0,9866
RESIDUAL	84	2,93031		0,513393		0,501488	
TOTAL	95						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 20. ANOVA's factoriales de las variables altura, número de hojas y de raíces en el primer subcultivo del primer ensayo de multiplicación de plántulas de ajo Criollo.

Fuente	GL	Altura		Hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Auxina / Kinetina (A)	2	194.956	0.4811	0.50765	0.6216	144.116	0.2166
Tratamiento introducción (B)	3	193.345	0.5358	178.345	0.1776	425.879	0.7107
AB	6	0.93342	0.9060	0.37868	0.9040	982.426	0.3919
RESIDUAL	83	264.123		106.153		868.224	
TOTAL	94						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 21. ANOVA's factoriales de las variables altura, número de hojas y de raíces en el segundo subcultivo del primer ensayo de multiplicación de plántulas de ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Auxina / Kinetina (A)	2	5,01579	0,1451	0,04486	0,8565	28,0803	0,0000**	3,24042	0,0329*
Tratamiento introducción (B)	3	7,20985	0,0428*	0,01212	0,9885	2,08482	0,4015	3,17075	0,0195*
AB	6	3,47676	0,2365	0,46747	0,1524	3,95087	0,0945	3,01079	0,0057* *
RESIDUAL	84	2,53829		0,288894		2,10521		0,910714	
TOTAL	95								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 22. ANOVA's factoriales de las variables altura, número de hojas y de raíces en el segundo subcultivo del primer ensayo de multiplicación de plántulas de ajo Criollo.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Auxina / Kinetina (A)	2	0,72513	0,6878	4,13909	0,0000	0,12521	0,6651	0,18644	0,6335
Tratamiento introducción(B)	3	2,49398	0,28232	0,005136	0,9960	1,08107	0,0182	1,44586	0,0177
AB	6	4,12195	0,0575	0,0138145	0,9993	0,2641	0,5246	0,14675	0,9013
RESIDUAL	83	1,92879		0,250645		0,60551		0,4062	
TOTAL	94								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 23. ANOVA de las variables altura, número de hojas y de raíces en el segundo ensayo de multiplicación de plántulas de ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Auxina / Kinetina (A)	2	0,968	0,4399	0,97917	0,4797	12,8	0,3963	2,1125	0,2919
Tratamiento introducción (B)	3	19,901	0,0000**	4,5145	0,0538	10,35	0,6242	6,94583	0,0154*
AB	6	9,01833	0,0016**	2,67917	0,0863	30,7667	0,1643	5,17917	0,0481*
RESIDUAL	84	1,60508		1,17361		17,575		1,87361	
TOTAL	95								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 24. ANOVA's factoriales de las variables altura, número de hojas y de raíces en el segundo ensayo de multiplicación de plántulas de ajo Criollo.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Auxina / Kinetina (A)	2	1,6000	0,6712	7,8125	0,0022* *	17,2125	0,3167	17,5792	0,0000
Tratamiento introducción (B)	3	3,2000	0,3122	3,57917	0,0052* *	154,013	0,0016	0,0125	0,9362
AB	6	8,9333	0,0412	0,179167	0,8747	109,146	0,0002	5,8125	0,0359
RESIDUAL	83	3,0889		0,776389		14,3653		1,943472	
TOTAL	94								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 25. ANOVA de las variables altura, número de hojas y de raíces para el tratamiento de multiplicación de Moriconi (1990) en plántulas de ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	18,9247	0,0000**	0,7000	0,3318	22,7583	0,4095	0,833333	0,4963
Intra grupos	36	1,45861		21,4000		23,0417		1,02778	
TOTAL	39								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 26. ANOVA de las variables altura, número de hojas y de raíces para el tratamiento de multiplicación de Moriconi (1990) en plántulas de ajo Criollo.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	8,2000	0,0544	1,49167	0,0313*	68,8669	0,0007	19,3667	0,0002
Intra grupos	36	105,8000		0,452778		347,8000		81,4000	
TOTAL	39								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 27. ANOVA de las variables altura, número de hojas y de raíces para el tratamiento de multiplicación de la FAO (1990) en plántulas de ajo Rubí-1.

Fuente	GL	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	9,99467	0,0127*	2,26667	0,1227	18,3583	0,2269	11,2917	0,0126*
Intra grupos	36	1,75156		1,1		12,1083		2,71944	
TOTAL	39								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 28. ANOVA de las variables altura, número de hojas y de raíces para el tratamiento de multiplicación de la FAO (1990) en plántulas de ajo Criollo.

Fuente	G L	Altura		Brotos/explante		hojas		Raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	9,6667	0,0043	2,4250	0,1385	57,4917	0,0425	4,0250	0,0748
Intra grupos	36	66,6000		44,7000		686,500		57,9000	
TOTAL	39								

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 29. ANOVA de la variable coeficiente de multiplicación en los subcultivos de plántulas de ajo Rubí-1 y Criollo.

Fuentes	GL	Rubí-1		Criollo	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	1,53202	0,0001**		
Intra grupos	8	0,0515667			
Total	11				

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 30. ANOVA de la variable coeficiente de multiplicación para las variedades de estudio.

Fuentes	GL	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	1	0,0722	0,7991
Intra grupos	6	1,01993	
Total	7		

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 31. ANOVA de las variables diámetro del bulbo, tamaño de la plántula y número de raíces en la etapa de microbulbificación de plántulas de ajo Rubí-1.

Fuentes	GL	Diámetro del bulbo		Tamaño de la plántula		Número de raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	35,6917	0,0000**	0,331667	0,8524	3,0	0,1281
Intra grupos	36	1,18611		1,26667		1,48333	
Total	39						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Cuadro 32. ANOVA de las variables diámetro del bulbo, tamaño de la plántula y número de raíces en la etapa de microbulbificación de plántulas de ajo Criollo.

Fuentes	GL	Diámetro del bulbo		Tamaño de la plántula		Número de raíces	
		Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value	Cuadrado medio	P-Value
Entre grupos	3	104,622	0,0000**	6,12	0,0155*	3,0	0,1281
Intra grupos	36	2,01008		1,54711		1,48333	
Total	39						

P-valor ≤ 0.05 y >0.01 existen diferencias significativas *

P-valor ≤ 0.01 existen diferencias altamente significativas **

Anexo D. Esquema de la micropapagación de ajo Rubí-1 y Criollo

