

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**“EFECTO DE LA VARIACIÓN DE MEDIOS Y CONCENTRACIONES DE
SACAROSA EN LA MULTIPLICACIÓN Y MICROBULBIFICACIÓN
IN VITRO, DE DOS ECOTIPOS DE AJO (*Allium sativum* L.)
PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLA DE ALTA CALIDAD”**

VICTOR HUGO MONRROY QUISPE

**La Paz - Bolivia
2009**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

“EFECTO DE LA VARIACIÓN DE MEDIOS Y CONCENTRACIONES DE SACAROSA EN LA MULTIPLICACIÓN Y MICROBULBIFICACIÓN *IN VITRO*, DE DOS ECOTIPOS DE AJO (*Allium sativum* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE SEMILLA DE ALTA CALIDAD”

Tesis de Grado presentado como requisito
Parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo

VICTOR HUGO MONRROY QUISPE

TUTOR:

Ing. Agr. Edgar Gómez Villalba.

ASESOR:

Ph.D. Víctor Hugo Mendoza Condori.

TRIBUNAL EXAMINADOR

Ph.D. Alberto Figueroa Soliz.

Ing. Agr. Eduardo Oviedo Farfán.

Ing. Agr. René Calatayud Valdez.

APROBADA

PRESIDENTE

2009

Dedicado con especial cariño a:

Dios, por ser la luz que alumbró mi camino, y a mi Madre, por brindarme todo su amor y cariño, por que a ella debo todo lo que soy.

AGRADECIMIENTOS.

Mis sinceros agradecimientos a:

- Al Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN - CIN Viacha) y todo su personal, por toda la ayuda y apoyo brindado.
- De forma muy especial al Ing. Edgar Gómez Villalba, y al Ph.D. Víctor Hugo Mendoza, por su importante colaboración, orientación y por sobre todo por haber confiado en mi persona, para la culminación de esta investigación.
- Al Ing. Eduardo Oviedo Farfán, Ing. René Calatayud y Dr. Alberto Figueroa por su permanente orientación y colaboración durante todo el desarrollo de esta investigación.
- A todo el personal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés quienes me brindaron todos los medios para forjar mi carrera profesional.
- A mi familia (Rafael †, Justina, Elba, Jorge, Cynthia y Jorge Andrés) por estar siempre a mi lado y ser mi fuerza e inspiración para seguir adelante.
- A mis queridos padrinos y primos Nelson Vera Monroy, Carla de Vera, Cristofer Nelson, Carmela Vera y sus estimados padres Adolfo Vera y Gloria Monroy de Vera por todo su cariño y apoyo brindado hacia mi persona.
- A mis amigos (Angélica Quenta, Rocío Castro, Ada Maldonado, Regina Callata, Aylin Caballero, Flora Yujra, Enrique Lizarazu, Erik Llanos, Rodrigo Inchauste, Vladimir Flores, Edwin Darío, Reynaldo Terán, José Luis Panozo, Juan Carlos Huaracacho) por formar parte de mi vida y acompañarme siempre con su sincera amistad.
- A todas aquellas personas que formaron parte de mi vida, quienes con su sonrisa, apoyo y cariño están siempre en mi corazón, antes ahora y siempre(*IDEM*) ...

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii

ÍNDICE GENERAL

	Página.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 OBJETIVOS.....	3
1.2.1 Objetivo general.....	3
1.2.2 Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 El ajo (<i>Allium sativum</i> L.).....	3
2.1.1 Origen y distribución.....	3
2.2 Características botánicas y taxonómicas.....	4
2.2.1 Taxonomía.....	4
2.2.2 Principales características botánicas.....	5
2.3 Cultivares o ecotipos.....	6
2.3.1 Ecotipo Colorado de Mendoza.....	6
2.3.2 Ecotipo Rosado de Italia.....	7
2.4 Fisiología.....	7
2.4.1 Desarrollo y crecimiento.....	7
2.4.2 Bulbificación.....	8
2.4.3 Dormancia.....	8
2.5 Composición química.....	9
2.6 Requerimientos del cultivo.....	9
2.6.1 Requerimiento de suelo.....	10
2.7 Plagas y enfermedades.....	10
2.7.1 Enfermedades causadas por hongos.....	10
2.7.2 Enfermedades causadas por nemátodos.....	14
2.7.3 Enfermedades causadas por insectos plagas.....	15
2.7.4 Enfermedades causadas por virus.....	16
2.8 Biotecnología vegetal.....	17
2.8.1 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	17
2.8.2 Cultivo de meristemas.....	18
2.8.2.1 Tejidos meristemáticos.....	20
2.8.3 Micropropagación <i>in vitro</i>	21
2.8.4 Fases de la micropropagación.....	21
2.8.4.1 Etapa preparativa.....	21

2.8.4.2	Etapa de establecimiento.....	22
2.8.4.3	Etapa de multiplicación.....	24
2.8.4.4	Etapa de microbulbificación.....	25
2.9	Medio nutritivo de cultivo.	26
2.9.1	Sales inorgánicas.....	27
2.9.2	Compuestos orgánicos.....	28
3.	LOCALIZACIÓN.....	35
3.1	Ubicación geográfica.....	35
3.1.1	Características climáticas.....	35
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1	Materiales.....	35
4.1.1	Material vegetal.....	35
4.1.2	Equipos de laboratorio.....	36
4.1.3	Material de vidrio.....	36
4.1.4	Material químico.	37
4.1.4.1	Medios de cultivo.	37
4.1.4.2	Reactivos.	37
4.1.5	Material de desinfección y asepsia.	37
4.1.6	Instrumentos e implementos de laboratorio.....	38
4.2	Metodología.	38
4.2.1	Ambiente de trabajo.	38
4.3	Fase 0. Selección y tratamiento del material vegetal.	40
4.3.1	Fase I. Etapa de establecimiento.	41
4.3.1.1	Desinfección del material vegetal.	41
4.3.1.2	Análisis estadístico.	42
4.3.1.3	Variables de respuesta.....	42
4.3.2	Fase II. Etapa de multiplicación.....	44
4.3.2.1	Diseño experimental.	45
4.3.2.2	Variables de respuesta.....	46
4.3.3	Fase III. Etapa de microbulbificación.	47
4.3.3.1	Diseño experimental.	48
4.3.3.2	Variables de respuesta.....	49
4.4	Modelo lineal aditivo.....	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
5.1	Etapa de establecimiento.....	53

5.1.1	Porcentaje de supervivencia.....	53
5.1.2	Porcentaje de contaminación.....	54
5.1.3	Número de hojas.....	55
5.1.4	Altura final del explante.....	61
5.2	Etapa de multiplicación.....	66
5.2.1	Número de raíces.....	66
5.2.2	Altura final de planta.	72
5.2.3	Número de hojas.....	78
5.2.4	Número de brotes adventicios.....	82
5.3	Etapa de microbulbificación.....	90
5.3.1	Número de microbulbillos.	90
5.3.2	Diámetro de microbulbillos.....	92
5.3.3	Diámetro de microbulbillos curados.....	99
5.3.4	Peso de microbulbillos <i>ex vitro</i>	105
5.5	Análisis económico.....	111
6.	CONCLUSIONES	116
7.	RECOMENDACIONES	118
8.	BIBLIOGRAFIA	119
	ANEXOS.....	125
	ANEXO 1. Sales orgánicas del medio basal Murashige & Skoog (1962). MS.....	126
	ANEXO 2. Murashige & Skoog Modificado. Con sales comerciales "MsM".....	127
	ANEXO 3. Medios de multiplicación.	128
	ANEXO 4. Medios de bulbificación.....	130
	ANEXO 5. Detalla características de equipos de laboratorio.	130
	ANEXO 6. Materiales de vidrio a utilizar en la elaboración de medios de cultivo.....	131
	ANEXO 7. Material de asepsia.....	131
	ANEXO 8. Análisis de costos variables y totales por vitroplanta.....	132
	ANEXO 9. Presupuesto.....	133

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características más representativas de los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.....	36
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la etapa de multiplicación.....	46
Cuadro 3. Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la etapa de microbulbificación.....	49
Cuadro 4. Análisis de supervivencia de meristemas.....	53
Cuadro 5. Análisis del porcentaje de contaminación.....	54
Cuadro 6. Número de hojas total y promedio por ecotipo.....	55
Cuadro 7. Varianza con respecto al número de hojas por cada ecotipo.....	56
Cuadro 8. Desvío estándar con respecto al número de hojas por cada ecotipo.	58
Cuadro 9. Coeficiente de variación para el número de hojas en cada ecotipo....	59
Cuadro 10. Error estándar para el número de hojas por cada ecotipo.....	60
Cuadro 11. Altura final en promedio, para cada ecotipo.....	61
Cuadro 12. Varianza de la altura final.....	62
Cuadro 13. Desvío estándar con respecto a la altura final del explante por cada ecotipo.....	63
Cuadro 14. Coeficiente de variación para la altura final del explante.....	64
Cuadro 15. Error estándar para la altura final del explante por cada ecotipo.....	65
Cuadro 16. Análisis de varianza para el número de raíces. (Multiplicación).....	66
Cuadro 17. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el número de raíces.....	67
Cuadro 18. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el número de raíces.....	67
Cuadro 19. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable número de raíces.....	68
Cuadro 20. Análisis de regresión lineal para los medios "Ms" y "Ms+EQ"	70
Cuadro 21. Análisis de regresión lineal para los medios "MsM" y "MsM + EQ"..	71
Cuadro 22. Análisis de varianza para altura final de planta.....	72
Cuadro 23. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para altura final de planta.....	73
Cuadro 24. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para	

altura final de planta.....	73
Cuadro 25. Análisis de regresión lineal para los medios “Ms” y ” Ms + EQ ” para la variable altura de planta (cm.).....	75
Cuadro 26. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y ” MsM + EQ”	76
Cuadro 27. Análisis de varianza para número de hojas.....	78
Cuadro 28. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el número de hojas.....	78
Cuadro 29. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el número de hojas.....	79
Cuadro 30. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y ” MsM + EQ”	81
Cuadro 31. Análisis de varianza para el número de brotes.....	83
Cuadro 32. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el número de brotes.....	83
Cuadro 33. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el número de brotes.....	84
Cuadro 34. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable número de brotes adventicios.....	85
Cuadro 35. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y ” MsM + EQ ” para la variable número de brotes.....	87
Cuadro 36. Análisis de varianza para el número de brotes bajo el efecto de Kin (1mg/L) y AIA (2 mg /L).....	88
Cuadro 37. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el número de brotes.....	89
Cuadro 38. Análisis de varianza para el número de microbulbillos.....	90
Cuadro 39. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el número de microbulbillos.....	91
Cuadro 40. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el número de brotes.....	91
Cuadro 41. Análisis de varianza para el diámetro de microbulbillos.....	93
Cuadro 42. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el diámetro de microbulbillos.....	93
Cuadro 43. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el diámetro de microbulbillos.....	94
Cuadro 44. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable diámetro de microbulbillo.....	95

Cuadro 45.	Análisis de regresión lineal para las concentraciones de sacarosa.	97
Cuadro 46.	Análisis de varianza para el diámetro de microbulbillos curados.....	99
Cuadro 47.	Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el diámetro de microbulbillos curados.....	100
Cuadro 48.	Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el diámetro de microbulbillos curados.....	100
Cuadro 49.	Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable diámetro de microbulbillo curado.	101
Cuadro 50.	Análisis de regresión lineal para las concentraciones de sacarosa.	103
Cuadro 51.	Análisis de varianza para peso de microbulbillos <i>ex vitro</i> .	105
Cuadro 52.	Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para el peso de microbulbillos <i>ex vitro</i>	106
Cuadro 53.	Diferencias entre medios de bulbificación por prueba de Duncan para el peso de microbulbillos <i>ex vitro</i>	107
Cuadro 54.	Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable peso de microbulbillo.....	107
Cuadro 55.	Análisis de regresión lineal para las concentraciones de sacarosa...	109
Cuadro 56.	Análisis de costos totales para la etapa de establecimiento.....	111
Cuadro 57.	Análisis de costos individuales para la etapa de establecimiento por cada explante.....	111
Cuadro 58.	Análisis de costos individuales para la etapa de multiplicación por cada vitroplanta.....	112
Cuadro 59.	Análisis de costos totales, individuales y relación beneficio / costo para la etapa de multiplicación.	112
Cuadro 60.	Análisis de costos individuales para la etapa de multiplicación bajo el efecto de reguladores de crecimiento Kinetina y AIA.....	113
Cuadro 61.	Análisis de costos totales, individuales y relación beneficio / costo para la etapa de bulbificación.....	114
Cuadro 62.	Análisis de costos individuales para la etapa de bulbificación bajo el efecto de las distintas concentraciones de sacarosa.....	115
Cuadro 63.	Costos individuales y por kilogramo de semilla pre-básica obtenida por los diferentes laboratorios de cultivo de tejidos vegetales.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ecotipos de ajo.....	35
Figura 2.	Bulbo con apropiadas características para introducción <i>in vitro</i>	40
Figura 3.	Meristemo apical de ajo visto en el estereoscopio (400 x).....	41
Figura 4.	Explantes descartados en la etapa de establecimiento.....	42
Figura 5.	Vitroplantas de óptimo desarrollo en la etapa de establecimiento.....	43
Figura 6.	Altura de vitroplanta registrada a los 42 días de establecimiento.....	43
Figura 7.	Formación de brotes adventicios en la etapa de multiplicación.....	44
Figura 8.	Formación de raíces en el ecotipo Colorado de Mendoza (a) y el ecotipo Rosado de Italia (b).....	46
Figura 9.	Formación de brotes en el ecotipo Colorado de Mendoza bajo el efecto del MsM + Kin y AIA.....	47
Figura 10.	Formación de microbulbillos del ecotipo Colorado de Mendoza (a) y del ecotipo Rosado de Italia (b).....	47
Figura 11.	Desarrollo de microbulbillos en el ecotipo Colorado de Mendoza al 6% de sacarosa y el ecotipo Rosado de Italia al 9% de sacarosa. .	48
Figura 12.	Cálculo del diámetro ecuatorial de microbulbillos, extraídos de concisiones <i>in vitro</i>	50
Figura 13.	Microbulbillos en la etapa de curado y medición del diámetro ecuatorial de microbulbillos curados.....	50
Figura 14.	Peso de microbulbillos, en balanza analítica.....	51
Figura 15.	Comparación del porcentaje de supervivencia de los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.....	54
Figura 16.	Comparación del porcentaje de contaminación de los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.....	55
Figura 17.	Comparación del número de hojas de los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.	56
Figura 18.	Comparación del máximo y el mínimo número de hojas con relación al promedio para el ecotipo Colorado de Mendoza.	57
Figura 19.	Comparación del máximo (5.06) y el mínimo (2.94) número de hojas con relación al promedio (4 hojas) para el ecotipo Rosado de Italia...	57
Figura 20.	Comparación del máximo y el mínimo número de hojas con relación	

	al promedio para los ecotipos Colorado y Rosado.....	58
Figura 21.	Comparación del coeficiente de variación para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, con respecto al número de hojas.....	60
Figura 22.	Comparación de la altura final que obtuvo el explante para los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.....	62
Figura 23.	Comparación de la altura máxima y mínima con relación al promedio, para los ecotipos Colorado y Rosado.....	63
Figura 24.	Comparación del coeficiente de variación para los ecotipos Colorado y Rosado, con respecto a la altura final del explante.....	64
Figura 25.	Comparación de medias para la variable número de raíces por efecto de los diferentes medios de multiplicación.....	68
Figura 26.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios (factor B) para la variable número de raíces.....	69
Figura 27.	Variación del número de raíces por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”	71
Figura 28.	Variación del número de raíces por efecto del extracto de quinua en los medios “MsM” y “MsM + EQ”	72
Figura 29.	Comparación de medias para la variable altura de planta (cm.) por efecto de los diferentes medios de multiplicación.....	74
Figura 30.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios (factor B) para la variable altura final de planta en cm.....	74
Figura 31.	Variación de la altura de planta (en cm.) por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”	76
Figura 32.	Variación de la altura de planta (en cm) por efecto del extracto de quinua en los medios “ MsM ” y “ MsM + EQ ”	77
Figura 33.	Comparación de medias para la variable número de hojas por efecto de los diferentes medios de multiplicación.....	79
Figura 34.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios de multiplicación (factor B) para la variable número de hojas	80
Figura 35.	Variación en el número de hojas por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”	81
Figura 36.	Variación en el número de hojas por efecto del extracto de quinua en los medios “MsM” y “MsM + EQ”	82
Figura 37.	Comparación de medias para la variable número de brotes por efecto de los diferentes medios de multiplicación.....	84

Figura 38.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios (factor B) para la variable número de brotes.....	86
Figura 39.	Variación en el número de brotes por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”	87
Figura 40.	Comparación de medias para la variable número de brotes bajo el efecto de Kin (1mg/L) y AIA (2 mg/L) en el medio MsM.....	89
Figura 41.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según las diferentes concentraciones de sacarosa (factor B) para la variable número de microbulbillos.....	92
Figura 42.	Comparación de medias para la variable diámetro de microbulbillo por efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa.....	94
Figura 43.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación en las concentraciones de sacarosa.....	96
Figura 44.	Variación del diámetro de microbulbillo del ecotipo Colorado de Mendoza por efecto de las concentraciones de sacarosa.....	97
Figura 45.	Variación del diámetro de microbulbillo del ecotipo Rosado de Italia por efecto de las concentraciones de sacarosa.....	98
Figura 46.	Comparación de medias para la variable diámetro de microbulbillo curado por efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa...	101
Figura 47.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación en las concentraciones de sacarosa.....	102
Figura 48.	Variación del diámetro de microbulbillo curado del ecotipo Colorado de Mendoza por efecto de las concentraciones de sacarosa.....	104
Figura 49.	Variación del diámetro de microbulbillo curado del ecotipo Rosado de Italia por efecto de las concentraciones de sacarosa.....	105
Figura 50.	Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación en las concentraciones de sacarosa.....	108
Figura 51.	Variación del peso de microbulbillo para el ecotipo Colorado de Mendoza por efecto de las concentraciones de sacarosa.....	109
Figura 52.	Variación del peso de microbulbillo del ecotipo Rosado de Italia por efecto de las concentraciones de sacarosa.....	110

RESUMEN

Actualmente el cultivo de ajo constituye una de las principales actividades agrícolas en nuestro país, manifestándose en uno de los cultivos con mayor potencialidad, debido al interés de diferentes grupos de productores e instituciones de mejorar la productividad del cultivo con fines de exportación.

Muchas de las áreas potenciales del país, en especial los valles de Cochabamba, Tarija y Potosí se encuentran inhabilitados debido a la alta incidencia de nematodos, hongos, bacterias y virus, reduciendo así los rendimientos, haciendo imposible alcanzar la calidad y cantidad adecuada para la exportación (Quezada, 1999).

La biotecnología, por medio de la técnica de cultivos *in vitro* genera alternativas viables para obtener plantas libres de enfermedades, con niveles altos de productividad.

En este sentido, el presente trabajo de investigación estuvo dirigido a evaluar el efecto de la variación de medios y concentraciones de sacarosa en la multiplicación y microbulbificación *in vitro* en dos ecotipos de ajo para la obtención de semilla de alta calidad libre de enfermedades.

La investigación estuvo dividida en tres etapas: El establecimiento, la multiplicación, y la microbulbificación, utilizando para ello los ecotipos "Colorado de Mendoza" y "Rosado de Italia".

En el establecimiento, los meristemos fueron extraídos asépticamente en la cámara de flujo laminar y cultivados en el medio basal "Ms", el principal parámetro de evaluación fue la supervivencia de los explantes, alcanzando un 95.8 % para el ecotipo "Colorado de Mendoza" y 89.58 % para el ecotipo "Rosado de Italia".

Para la fase de multiplicación la finalidad fue la obtención del mayor número de brotes, utilizando los medios "Ms", "MsM", "MsM + EQ" y "Ms+ EQ" (EQ = extracto quinua). El medio de que favoreció a la formación de brotes fue el "MsM" con un promedio de 1.5 ; sin embargo los resultados obtenidos fueron todavía insuficientes por tanto, en una simultánea investigación se utilizó como medio basal el "MsM" más la acción de Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L) donde el número de brotes aumento satisfactoriamente a 2.2 brotes por vitroplanta.

Para la etapa de microbulbificación el objetivo fue determinar la concentración adecuada de sacarosa (3%,6%,9%,12%) para promover el proceso de microbulbificación. La concentración óptima para el ecotipo "Colorado" fue de 60 g/L de sacarosa desarrollando microbulbillos de 5.3 mm de diámetro, mientras que para el ecotipo "Rosado" la concentración óptima fue de 90g/L. de sacarosa alcanzando a desarrollar microbulbillos mayor a 7.2 mm de diámetro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los dos ecotipos de ajo demostraron un comportamiento favorable al proceso de microbulbificación, alcanzando a producir semilla de alta calidad libre de enfermedades.

SUMMARY

At the moment the cultivation of garlic constitutes one of the agricultural main activities in our country, being constituted in one of the cultivations with more potential, due to the interest of different groups of producers and institutions of improving the productivity of the cultivation for export.

Many of the arable areas of the country especially the valleys of Cochabamba, Tarija and Potosí are disabled due to the high incidence of nematodes, fungus, bacterias and virus in their soils, reducing this way the yields, making impossible to reach the quality and appropriate quantity for their export (Quezada, 1999).

The biotechnology, by means of the technique of cultivations in vitro generates alternative viable to obtain plants free of disenses, with high levels of productivity.

Bythewey, the present investigation work was directed to evaluate the effect of the variation of means and sucrose concentrations in the multiplication and microbulbificación in vitro in two ecotipos of garlic for the obtaining of seed of high quality free of disenses.

The investigation was divided in three stages: The establishment, the multiplication, and the microbulbificacion, using for it the ecotipos "Colorado de Mendoza" and "Rosado de Italia".

In the establishment, the meristemos was extracted aseptically in the camera of flow to laminate and cultivated in the means basal "Ms", the main evaluation parameter was the survival of the explantes, reaching 95.8% for the ecotipo "Colorado de Mendoza" and 89.58% for the "Rosado de Italia".

For the multiplication phase the purpose was the obtaining of the biggest (EQ = extract of quinua) number of buds, using the means "Ms", "MsM", "MsM + EQ" and "Ms+ EQ." The means that it favored to the formation of buds it was "MsM" with an average of 1.5; however the obtained results were still insufficient therefore, in a simultaneous investigation it was used like half basal "MsM" more the action of Kinetina (1mg/L) and AIA (2 mg / L) where the number of buds increase satisfactorily to 2.1 buds for vitroplanta.

For him microbulbificación stage the objective was to determine the appropriate concentration of sucrose (3%, 6%, 9%, 12%) to promote the microbulbificación process. The good concentration for the ecotipo Colorado was of 60 sucrose g/L developing microbulbillos of 5.3 mm of diameter, while for the Rosy ecotipo the good concentration was of 90g/L. of sucrose succeeding in developing bigger microbulbillos to 7.2 mm of diameter.

In accordance with the obtained results, the two ecotipos of garlic demonstrated a favorable behavior to the microbulbificación process, succeeding in producing seed of high quality free of illnesses.

1. INTRODUCCIÓN.

El ajo (*Allium sativum* L.) es el condimento natural por excelencia y forma parte de los hábitos alimentarios y terapéuticos de muchas culturas. Los departamentos de Chuquisaca, Potosí y Tarija, ubicados al sur de Bolivia, son los departamentos de mayor producción a nivel nacional, a pesar que el cultivo del ajo también se encuentra en los departamentos de Cochabamba, Oruro, La Paz y Santa Cruz en menor escala.

Actualmente el cultivo de ajo constituye una de las principales actividades agrícolas su rendimiento en promedio alcanza 9.7 TM /Ha (FAO, 1995). Es uno de los cultivos con mayor potencialidad, debido al interés de diferentes grupos de productores e instituciones de mejorar la productividad del cultivo con fines de exportación (Cabrera y Elliot, 1996).

El departamento de mayor producción entre los periodos del 1993-94 al 1997-98, fue Chuquisaca, con un promedio de 309.4 Ha, seguido por Tarija con un promedio de 292.8 Ha, Cochabamba (79.0 Ha), Potosí (77.2 Ha), luego Santa Cruz, Oruro y La Paz (INE, 2000).

La producción de ajo del sur de Bolivia cerca al 80% va al consumo en fresco en el mercado nacional y de exportación (tanto legal como por contrabando), luego un 20% para semilla (debido a los bajos rendimientos) y menos de un 1% es destinado a la industria (MACIA, 2003).

También se debe anotar, que en los últimos años, existió una fuerte tendencia al incremento de superficies cultivadas en el departamento de Potosí con la expansión de cultivos en las áreas de Tupiza y Cotagaita, mientras que en el departamento de Tarija las superficies cultivadas se mantuvieron relativamente estables y en el departamento de Chuquisaca existió una tendencia al decremento, confinándose el cultivo a las zonas de Incahuasi y Culpina (MACIA, 2003).

A partir de esta constatación, se considera que actualmente el primer departamento productor es Potosí, aun que muy de cerca y compitiendo este lugar Tarija y en tercer lugar el departamento de Chuquisaca.

Es un cultivo de alto interés social y económico, ya que ocupa mucha mano de obra (tanto en cultivo como en empaque). Es una de las pocas alternativas hortícolas bajo riego durante el invierno y tiende a ser un producto agroexportable a futuro por sus condiciones geográficas limítrofes con el mayor comprador de ajo que es el Brasil (MACIA, 2003).

Muchas de las áreas cultivables del país en especial los valles de Cochabamba, Tarija y Potosí se encuentran inhabilitados debido a la alta incidencia de nematodos, hongos, bacterias y virus en sus suelos, reduciendo así los rendimientos, haciendo imposible alcanzar la calidad y cantidad adecuada para su exportación (Quezada, 1999). Para solucionar dicho problema es una necesidad imperiosa la producción y uso de semilla certificada, ya que la gran incidencia de problemas fitosanitarios en Bolivia se debe principalmente a los defectuosos mecanismos de importación de semilla y del proceso de reproducción y propagación propios del ajo, las cuales constituyen problemas en la producción y productividad del cultivo.

Si consideramos que el ajo es una planta que carece de semilla botánica viable, (agámica) actualmente, es una alternativa la multiplicación *in vitro*, que ofrece ventajas como: Niveles altos de sanidad, plantas genéticamente iguales a la planta madre (homogeneidad), y en especial la producción de semilla de alta calidad por medio de la técnica de microbulbificación, situación que permitirá eliminar eficazmente la presencia de virus y otros patógenos (Quezada, 1999).

En este sentido, el presente trabajo de investigación esta dirigido a evaluar el efecto de la variación de medios y concentraciones de sacarosa en la multiplicación y microbulbificación *in vitro* en dos ecotipos de ajo, para la obtención de semilla de alta calidad libre de enfermedades.

1.2 OBJETIVOS.

1.2.1 Objetivo general.

- Evaluar el efecto de la variación de medios y concentraciones de sacarosa en el proceso de multiplicación y microbulbificación *in vitro*, de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) para la obtención de semilla de alta calidad.

1.2.2 Objetivos específicos.

- Evaluar el comportamiento morfológico del explante en las etapas de establecimiento, multiplicación y microbulbificación *in vitro*.
- Determinar el mejor medio nutritivo para promover el proceso de multiplicación.
- Determinar la concentración adecuada de sacarosa para promover el proceso de microbulbificación.
- Evaluar la respuesta morfológica de los dos ecotipos de ajo, al proceso de microbulbificación.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 El ajo (*Allium sativum* L.)

Es una de las plantas más extendidas en el mundo por sus usos culinarios y por sus cualidades benéficas para la salud humana, por lo que ha sido muy estudiada para probar sus propiedades aplicadas ampliamente en la medicina tradicional mundial. Representa un recurso de gran valor en la industria alimentaria como complemento dietario o por sus propiedades nutracéuticas. Tradicionalmente ha sido usado en medicina popular para tratar dolencias como: reumatismo, dermatitis, dolores abdominales, tos, pérdida de apetito, desórdenes estomacales, infecciones parasitarias. A estos usos actualmente se le suman síndromes que aquejan a sociedades modernas tales como arteriosclerosis e hipertensión (Giulietti, 1998).

2.1.1 Origen y distribución.

Según Vavilov (1951); citado por Valadez (1993), menciona que su centro de origen es el Asia Central, incluyendo al noroeste de la India, desde donde se propago al mediterráneo y de ahí al resto del mundo. El ajo, fue domesticado por el hombre para ser usado primero como condimento y luego como planta medicinal.

Se introdujo en América por los conquistadores españoles probablemente a través de México, desde donde fue diseminado hasta Chile por el Sur y posteriormente fue introducido en el hemisferio Norte, donde constituye en la actualidad un cultivo de importancia económica (FAO, 1988).

El nombre romano del ajo es *Allium* y *sativum* proviene del latín y quiere decir cultivado (Cabrera y Elliot, 1996).

Es una especie que depende de las condiciones termofotoinductoras y se encuentra distribuida desde el Ecuador hasta los 40 ° LS y desde el nivel del mar hasta los 3700 m.s.n.m, lo que demuestra su amplia capacidad de adaptación (Burba, 1992).

2.2 Características botánicas y taxonómicas.

2.2.1 Taxonomía.

En el Registro de colección de Invernadero de “Ecology and Evolutionary Brief” (1999) el ajo se clasifica de la siguiente manera:

Reino	: <i>Vegetal.</i>
Subreino	: <i>Embryobionta.</i>
División	: <i>Magnoliophyta.</i>
Clase	: <i>Liliopsida.</i>
Subclase	: <i>Lilidae.</i>
Orden	: <i>Liliales.</i>
Familia	: <i>Alliaceae.</i>
Género	: <i>Allium</i>
Especie	: <i>sativum</i> L.

2.2.2 Principales características botánicas.

El ajo es una planta anual de reproducción vegetativa, que al finalizar su ciclo de vida muere, quedando con vida las yemas que se forman en los dientes, mediante las cuales realiza su reproducción (Burba, 1992).

a) Sistema radicular.

La raíz se considera por su origen adventicia, del tipo caulógena, es decir aquellas que se desarrollan del tallo, formando así un sistema radicular fibroso, muy parecido al de la cebolla; su medio de vida subterráneo teniendo un geotropismo positivo además de ser un órgano eficiente en la absorción de agua y compuestos minerales, sus raíces alcanzan una profundidad de 5 - 25 cm. (MINAG, 1983).

b) Tallo.

Es el órgano de transporte, soporte y estructuración, en algunas circunstancias cumple la función fotosintética y almacenaje de sustancias nutritivas dispuestas por las características genéticas propias de cada especie (Rodríguez, 1983).

En el caso del ajo consideramos que la planta cuenta con tres tipos de tallos:

- **Acaule.**

Es el tallo verdadero, muy corto, se encuentra en la base de la planta y muere totalmente al final del ciclo vegetativo, su función es formar el sistema radicular adventicio (Rodríguez, 1983).

- **Bulbo.**

Es el órgano donde se acumulan las sustancias nutritivas; las túnicas externas envuelven el bulbo entero y las internas a los dientes, estos últimos se componen de: túnica apergamada, túnica carnosa, yema y tallo verdadero. Los dientes en el bulbo pueden ser simples o compuestos; los simples tienen una sola yema y los compuestos dos o más y su número en el bulbo o cabeza depende de la variedad. El proceso de acumulación de sustancias nutritivas se intensifica después que cesa la formación de las yemas y el crecimiento intenso de las hojas (Giacconi, 1993).

- **Escapo.**

Estructura no ramificada que se origina del bulbo subterráneo, al igual que las hojas cumple la función fotosintética, no crece más de 50 cm en la parte terminal sostiene a una inflorescencia del tipo umbela (Rodríguez, 1983).

c) Hojas.

Las hojas se forman después de terminado el estado de reposo de los dientes y constan de limbo y vaina en forma de canal con un ápice agudo, de borde liso y nervadura paralelinervia propia de las especies de este género (MINAG, 1983).

d) Flores.

Dispuestas en inflorescencias del tipo umbela, sus flores son pequeñas, blancuzcas o rojizas, actinomorfas hermafroditas, su perigonio compuesto de seis piezas, de ovario súpero. El fruto es una cápsula que encierra unas semillas negras arriñonadas (Rodríguez, 1983).

2.3 Cultivares o ecotipos.

Los tipos comerciales de ajo más difundidos a nivel mundial son "blanco", "colorado" y "rosado". Brasil importa preferentemente ajos rojos (morados o colorados), de calibre mediano a grande. Francia consume casi exclusivamente ajos "blancos" y "rosados" o "violetas", de producción propia o importada. Estados Unidos industrializa prácticamente todo lo que produce, importando el ajo fresco; si bien prefiere el "blanco", las compras de ajo "colorado" son cada vez más frecuentes (MACIA, 2003).

2.3.1 Ecotipo Colorado de Mendoza.

El ajo producido en Bolivia es el Colorado Mendocino que se considera de excelente calidad por su fuerte aroma y sabor y que tiene buena aceptación en los mercados internacionales. Los rendimientos son variables según la técnica del cultivo, las variedades de las que se trate y la forma de medirlos (MACIA, 2003).

Se cultiva principalmente en el departamento Potosí, muy de cerca y compitiendo por este lugar Tarija y en tercer lugar el departamento de Chuquisaca (INE, 2001).

Se caracteriza por tener un ciclo de dormancia de 140 días y un ciclo vegetativo de 220 días (Moriconi *et al.*, 1991). Son clones de alto requerimiento de frío y fotoperiodo largo.

Las plantas son generalmente semirectas cuando adultas, de desarrollo medio, con hojas de ancho intermedio a angostas. Los bulbos son medianos a grandes, bien formados de color externo blanco cuando seco, pero de dientes colorados con tintes violáceos o púrpuras. Burba, (1991); citado por Quezada, (1999).

Tres Universidades de los departamentos productores en estudio están ligadas a la investigación, sin embargo es la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, de Tarija, la que cuenta actualmente con un programa de investigación, destinado a la producción de semilla prebásica de ajo, mediante el cultivo *in vitro* de las principales variedades de ajo producidas en la zona e Iscayachi (Colorado mendocino, y Colorado criollo de Iscayachi) (MACIA, 2003).

2.3.2 Ecotipo Rosado de Italia.

Burba, (1991); citado por Quezada, (1999), señala que: Son clones de corta dormancia y ciclo vegetativo corto con medianos a bajos requerimientos de frío y moderada necesidad de fotoperiodo largo. Las plantas son generalmente erectas, de hojas anchas y color verde intenso que no manifiestan externamente escapo floral, pero si, dientes laterales apoyados en la misma. Los bulbos son medianos y presentan gran número de dientes irregulares de color rosado claro o violáceo.

2.4 Fisiología.

2.4.1 Desarrollo y crecimiento.

Vigliola (1986), cita los siguientes puntos:

- a) La hoja de brotación crece a través de la hoja de reserva; en su interior también lo hacen las hojas del follaje.
- b) Del tallo emergen las raíces, que pueden desarrollarse antes según la humedad del ambiente.
- c) La hoja de brotación emerge por la parte superior del diente, crece hasta llegar a la superficie; posteriormente las hojas de follaje la atraviesan.
- d) La hoja de reserva prácticamente ha sido consumida; ésta y la hoja de brotación desaparecerán con el tiempo.

La madurez se conoce por el cambio de color de las hojas y el falso tallo, existiendo diversos criterios, ya sea la presencia de sólo dos o tres hojas nuevas verdes, o la flexión de la planta para realizar la cosecha del cultivo. Cuando se trata de ajo para semilla, y siempre que las condiciones lo permitan, la cosecha deberá efectuarse a madurez plena, es decir, cuando la planta no sólo se pone amarilla sino que se seca, garantizando el traslado de todos los productos de síntesis al bulbo (Burba, 1992; Giaconi, 1993). El curado es la etapa posterior, que consiste en someter a los bulbos a temperaturas entre 25 – 30 ° C de cuatro a siete días al sol y humedad relativa entre 60 - 70 % (Burba, 1992).

2.4.2 Bulbificación.

El mismo autor señala:

- Las yemas axilares de las hojas centrales comienzan a acumular sustancias de reserva en una de las hojuelas (de reserva).
- El crecimiento de las hojas se detiene y posteriormente se tornan amarillentas.
- Por debajo del “diente” se encuentra una zona de abscisión por la cual se independizará de la planta madre.

2.6.3 Dormancia.

Medina (1990), indica que la dormancia en el ajo, puede ser conceptuada como una forma de reposo, por cuanto es un estado dinámico en el cual el crecimiento de la hoja de brote, se halla temporalmente suspendido, ocurriendo sin embargo cambios bioquímicos lentos, graduales pero permanentes.

El concepto más generalizado, define a la dormición como el estado en el cual el crecimiento está temporalmente suspendido. No se habla de reposo, porque en la práctica es un proceso dinámico de cambios graduales y permanentes. La etapa final de la bulbificación, coincide con la inducción del período de dormición, que está asociado a bajos niveles de auxinas y giberelinas y alto nivel de inhibidores como el ácido abscísico (ABA) y otros muy solubles en agua (Stahlschmidt, 1991).

El proceso de dormición en el "diente semilla" está localizado en la hoja de reserva. Dicho período está regulado por factores hormonales, nutricionales, morfológicos e inclusive de tipo mecánico. Cabe destacar, además, que el inicio del proceso de dormición comienza en el cultivo coincidiendo con la diferenciación del diente axilar (Arguello, 1991).

2.7 Composición química.

El ajo posee un alto contenido calórico: 114 kcal por cada 100 gr, sus componentes mayoritarios son el agua, los hidratos de carbono (24,3%) y la fibra (1,2%), y en menor proporción, contiene proteínas (5,3%), grasas (0,23%) y minerales como cinc (1,1 mg/100 g), fósforo (134 mg), calcio (17,8 mg) y hierro (1,2 mg), y algunas vitaminas, entre las que destaca la vitamina C (14 mg) y en menor cantidad B1 (0,16 mg), B2 (0,02 mg) y vitamina A (MINAG, 1983).

El aroma característico del ajo se debe a una reacción enzimática que se lleva a cabo cuando los bulbillos son cortados, machacados o triturados. Cuando un diente está intacto, contiene principalmente **alliína** (sulfóxido de S-alil-cisteína). Al machacarlo, la enzima llamada alinasa o S- alquil - cisteína - sulfóxidasa, que está presente en el ajo, actúa transformando la alliína en alicina y ésta, al oxidarse, da lugar al **disulfuro de dialilo** que es el compuesto básico del olor y sabor en el ajo (Mendiola, 2001).

2.8 Requerimientos del cultivo.

El ajo es una planta bianual, se considera como una de las hortalizas más resistentes al frío. Tompson y Nelly (1959); citados por Valadez (1993), reportan que necesita temperaturas frescas (15 °C) y fotoperiodos cortos (menos de 10 horas) para su desarrollo vegetativo, y que para la formación del bulbo debe haber temperaturas ambientes mayores a 20 °C y días largos (más de 12 horas).

Este cultivo requiere clima fresco a frío durante el desarrollo inicial y caluroso y luminoso desde que comienza a formarse el bulbo hasta la cosecha. Cuando la planta no ha estado sujeta a bajas temperaturas, esto puede traducirse en que el bulbo no se forme, aun cuando los días sean largos; con temperaturas medias diarias muy próximas o por debajo de los 21°C durante 40 días se obtienen los mejores rendimientos, pero cuando el descenso de las mismas ocurre durante los primeros 30 días de la plantación o 70 días después de la siembra los rendimientos disminuyen considerablemente (Giacconi, 1993).

2.6.1 Requerimiento de suelo.

Requiere para su cultivo suelos profundos y fértiles, de consistencia media, permeables, con una proporción equilibrada de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K). Los riegos tienen gran importancia, ya que interactúan con otros factores, tales como los bioclimáticos y la fertilización, por lo que para lograr un crecimiento satisfactorio y una producción aceptable es conveniente mantener el suelo prácticamente a capacidad de campo durante todo el período (Giacconi *et al.*, 1993).

La regulación de un adecuado régimen hídrico, durante el crecimiento y desarrollo del ajo, contribuye a la obtención de bulbos de mayor tamaño y mejor formado. Durante la etapa de formación de follaje, la planta no debe carecer de humedad. Pero en la etapa de formación de las yemas, la humedad del suelo debe ser media. Una alta humedad en este período, puede estimular el crecimiento, debido a que las yemas recién formadas pueden germinar en lugar de convertirse en dientes normales (Huerres y Caraballo, 1991).

Se debe evitar suelos arcillosos y compactos, recomendándose los limosos, orgánicos y bien drenados. En cuanto a su pH, el ajo está clasificado como moderadamente tolerante a la acidez, siendo su rango de pH = 5.5 – 6.5 (Valadez, 1993). Con respecto a la salinidad está clasificado como medianamente tolerante con valores de 4 a 5 mmhos (2560 a 3200 ppm).

2.7 Plagas y enfermedades.

Las principales enfermedades que atacan al ajo se caracterizan por el ataque de hongos, nemátodos, virus, plagas descritas de la siguiente forma:

2.7.1 Enfermedades causadas por hongos.

a) Roya del ajo y la cebolla (*Puccinia porri*).

Puede afectar al ajo, puerro, cebolla, apio. Los síntomas de la roya del ajo son muy llamativos, ya que las pústulas son de color pardo-anaranjado muy brillante si eliminamos la epidermis. Las esporas son naranjas y brillantes. Una vez que acaba el ciclo de la enfermedad las pústulas varían a pardo oscuro (Villaroel, 1994).

Siempre y cuando el ataque de roya se produzca cuando el bulbo ya esté formado carece, entonces, de importancia. Ataques más precoces pueden llegar a desecar las hojas, acelerar la maduración y disminuir los rendimientos.

Esta enfermedad también puede afectar a otras especies de *allium* como son la cebolla y la cebolleta. Los síntomas en las hojas son puntos pequeños blancos que se tornan a amarillos y más tarde naranjas y que se convierten en las pústulas llamadas uredinas. Estas pústulas amarillas producen las esporas, las urediosporas que reinfectan al ajo en la misma estación. En largas distancias son diseminados por el viento. Las pústulas se vuelven negras, ya que se transforman en telios que contienen teliosporas, estado que le permite sobrevivir largos periodos de tiempo y que sirven de fuente de inóculo para las infecciones de cosechas sucesivas. Las hojas pueden infectarse tan gravemente que parezcan casi anaranjadas por completo.

b) Podredumbre blanca (*Sclerotium cepivorum*)

Putridión blanca, ocasionada por el hongo *Sclerotium cepivorum* también de alta incidencia en algunas parcelas de las zonas de estudio y que puede mantenerse en el suelo hasta 10 años en ausencia de *alliaceas*. De acuerdo al estudio del PRODIZAVAT, se detectó la presencia de este patógeno en el 40 % de las muestras de cultivos en la zona de Iscayachi y el 67 % en la zona de Churqui y Ñoquera. Debemos mencionar que si bien esta enfermedad no está diseminada en todas las zonas en estudio, sí existen focos importantes en la mayoría de las comunidades dedicadas a la producción de Ajo o cebolla (MACIA, 2003).

Tanto *Sclerotium cepivorum* y *Ditylenchus dipsaci* K. son las principales causas de pérdidas importantes de rendimientos en la zona de producción de ajo, que además actúan sinérgicamente, atacando inicialmente el nematodo que abre las puertas para la entrada. Su síntoma es la podredumbre basal blanca; si el ataque es tardío puede pasar inadvertido en la cosecha y desarrollarse posteriormente, aún cuando el ajo se conserve en cámaras frigoríficas. Es difícil el control, recomendándose además de tratamientos con agroquímicos, las siguientes prácticas complementarias: erradicación de toda planta con sintomatología, destrucción del rastrojo, rotación con otros cultivos, no con liliáceas., evitar encharcamiento del hongo *S. cepivorum*. El principal vehículo de diseminación de estas enfermedades es el intercambio de semillas infectadas (MACIA, 2003).

c) Raíz rosada (*Pyrenochaeta terrestris*)

Mediante reportes de técnicos que trabajaron en comunidades de Tupiza, e informes de análisis fitopatológicos de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho de Tarija, podemos constatar una creciente presencia de la enfermedad “Raíz rosada” causada por el hongo *Phoma terrestris* (Syn: *Pyrenochaeta terrestris*) en varias parcelas de las comunidades, esto como resultado del intercambio de semillas que se realiza sin ningún tipo de control. El control de estos patógenos deberá ser un fin común, y basados en el uso de semillas sanas, desinfección de semillas y rotación de cultivos (MACIA, 2003).

Ataca las raíces, las cuales se deshidratan, se acintan y mueren, tomando generalmente un color rojizo característico. La planta vuelve a formar raíces. La enfermedad se presenta en cualquier momento de desarrollo del cultivo. Al afectar el sistema radical, se reduce el suministro de nutrientes, la planta se debilita y produce un bulbo más pequeño. En algunos casos el follaje se presenta amarillento, principalmente en las hojas basales.

d) Ajo cabeza negra (*Helminthosporium allii*)

Luego con niveles de incidencia medios se detectó en las diferentes zonas de estudio los hongos *Helminthosporium allii* que provoca la cabeza negra del Ajo con manchas en las catáfilas externas descartando el bulbo para la exportación (MACIA, 2003).

Las catáfilas externas que cubren al bulbo y bulbillo se presentan oscuras, debido al desarrollo de esporas del hongo. Comúnmente afecta sólo las catáfilas protectoras, pero también se ha detectado invadiendo los tejidos carnosos del bulbillo durante las primeras etapas de crecimiento del cultivo. En este caso, las plantas jóvenes muestran síntomas de debilitamiento y clorosis. En el pseudotallo, a nivel de la superficie del suelo, la enfermedad provoca manchas irregulares extendidas y oscuras, debido a que se cubren con fructificaciones conidiales del hongo.

e) Mancha herrumbre (*Fusarium oxysporium. sp. cepae*)

Enfermedad que también causa pérdidas de emergencia y muerte de plantas. Para el control de estas enfermedades también se recomienda la selección de bulbillos y desinfección de semilla (MACIA, 2003).

Se manifiesta en túnicas carnosas del bulbillo y en la zona del disco, por pequeñas lesiones o pústulas castaño rojizo o color herrumbre que pueden distribuirse en toda la superficie del “diente” en número variable. Posteriormente, la mancha se deprime en el centro y forma un borde ligeramente elevado. A medida que la enfermedad progresa, el micelio del patógeno puede invadir gran parte del bulbillo, que se torna parduzco, al tiempo que se deshidrata, produciendo una podredumbre seca.

f) Moho azul (*Penicillium corymbiferum*)

Se detecto la presencia generalizada del Moho azul, ocasionado por el hongo *Penicillium corymbiferum*, sin embargo esta es una enfermedad ubiquiste, presente en todas las zonas del mundo donde se cultive ajo, que puede tener alta significancia en la perdida de emergencia de las plantas, muerte de plantas en el desarrollo del cultivo y pudriciones en poscosecha. El control de esta enfermedad se lo realiza mediante la selección de bulbillos sanos y la desinfección de semilla (MACIA, 2003).

Afecta en las diferentes etapas de desarrollo del ajo y en almacenamiento. Los síntomas se caracterizan por el desarrollo de un moho o polvillo azul verdoso en los bulbillos, que aparece sobre lesiones necróticas. Estas lesiones son de color café claro, hundidas y son visibles al sacar la túnica protectora. El daño en los bulbos afectados se presenta como una deshidratación. Después de la plantación la enfermedad se manifiesta en forma de pudrición, por lo que algunas plantas no llegan a emerger. Las que lo logran muestran amarillez generalizada, escaso desarrollo y marchites. Finalmente, parte de ellas mueren y otras ven disminuido su rendimiento. El hongo sobrevive en los bulbos almacenados, siendo estos la principal fuente de infección, ya que *P. hirsutum* no habita en el suelo. Para su control se recomienda Efectuar un buen curado de los bulbos, evitar heridas durante el proceso de desgrane de los bulbos, tratar con fungicidas como Thiabendazol+ Thiuram Mertect 40wp + Pomarsol Forte 80% WP 200 g + 300g (Villaroel, 1994).

2.7.2 Enfermedades causadas por nematodos.

a) Nematodo del tallo y bulbos (*Ditylenchus dipsaci*)

Endoparásito migratorio que se alimenta en el tejido parenquimoso, en tallos y bulbos. Los machos y las hembras son vermiformes los adultos miden de 0.9 a 1.8 mm de largo la semilla infestada pierde su color natural desde la base a la punta y cuando la infestación es severa el tallo verdadero se ve carcomido. Los bulbos presentan su base necrosada y aspecto corchoso. Las plantas atacadas, presentan un menor desarrollo y al tirarlas de las hojas, parte del tallo queda en el suelo. Son necesarias temperaturas superiores a 14 °C para mostrarse activos. El número de huevos suele ser de 350-600. La incubación se realiza con rapidez. Con temperaturas adecuadas el ciclo suele durar entre 20 y 40 días. El número de generaciones suele estar sujeto a las condiciones ambientales, pudiendo decir que se encuentra entre 4 y 9 generaciones anuales. La reproducción puede ser por partenogénesis sexual (Villaroel, 1994).

Escaso desarrollo de las plantas afectadas y en casos graves la muerte de las mismas. Algunas veces los ataques se localizan en principio a rodales que posteriormente se extienden a todo el cultivo. Forman “agallas” o “nódulos” en las raíces. Es imprescindible el análisis etológico y además antes del cultivo para poder realizar el tratamiento en condiciones favorables. Las cosechas se reducen mucho en rendimiento. Se recomienda hacer análisis nematológico del suelo y la semilla antes de plantar. Si el análisis es positivo en el suelo, el control a la semilla se debe complementar con aplicaciones al suelo con Carbodan 10 G o Curaterr 10% GR (Carbofurano) en dosis de 10 a 30 Kg/ha y Temik 15 G (Aldicard) en dosis de 15 kg/ha acompañados una buena rotación de cultivos, intercalando plantas no sensibles. Elección de variedades resistentes (Villaroel, 1994).

Se ha determinado la presencia de nematodos del ajo, *Ditylenchus dipsaci*, con una alta incidencia en todas las zonas de producción de los tres departamentos, debido a que este nematodo es transmitido mediante la “semilla” de ajo y también esta presente en otros cultivos de *alliaceas* como la cebolla y diversos cultivos de cereales. El nematodo del ajo es una de las principales enfermedades del ajo que puede diezmar totalmente la cosecha, dependiendo la población de individuos en el suelo.

De acuerdo a estudios realizados por el PRODIZAVAT existe una alta población de este patógeno en las zonas de Churqui y Ñoquera y aun que menor en la zona de Iscayachi, este se haya ampliamente difundido (Martínez, 1996).

2.7.3 Enfermedades causadas por insectos plagas.

a) Trips (*Thrips tabaci*)

Son especies cosmopolitas que afectan a una serie de cultivos, pero se concentra principalmente en ajos y cebollas. Los trips se ubican de preferencia en las axilas de las hojas. El daño en la planta es causado por las ninfas y los adultos que destruyen las áreas epidérmicas de la planta con su aparato bucal. Como efecto de este daño, las hojas presentan una coloración plateada que luego, al oxidarse, se vuelve amarilla; casos más graves producen una deformación de las hojas (Burba *et al.*, 1992).

La mayoría de las especies de tisanópteros o trips no miden más de 15 mm en su etapa adulta; algunas carecen de alas, pero otras tienen dos pares de alas cortas ribeteadas de pelos. Tanto los adultos como las ninfas tienen piezas bucales perforadoras y chupadoras. Aunque los tisanópteros polinizan algunas plantas y también se alimentan de algunas plagas de insectos, son considerados a su vez plagas, se debe proceder a realizar aplicaciones de insecticidas en horas de la mañana o en la tarde, que es cuando el insecto prefiere salir a comer (Méndez, 1995).

b) Ácaros del bulbo (*Eriophyes tulipae*)

Es de importancia económica en la semilla y el almacenamiento de bulbos. Estos penetran por debajo de la túnica rompiendo los tejidos del diente, cambiando los dientes de color crema a café mostaza y brillantes (Villaroel, 1994).

c) Mosca del bulbo. (*Hylemia antiqua*)

Las larvas penetran a los tejidos de los bulbos, así como a la axila del cuello. Por las heridas penetran bacterias y provocan pudrición (Villaroel, 1994).

2.7.4 Enfermedades causadas por virus.

Se cuenta con un estudio de los virus que afectan al Ajo, detectados en la variedad Colorada criolla de Iscayachi, realizado por Martínez, (1995) donde se indica la reacción serológica mediante el test de ELISA de los Potyvirus Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) y Leek Yellow Stripe Virus (LYSV) ambos virus que causan mosaicos y amarillamiento del ajo con perdidas importantes de rendimientos y un Carlavirus emparentado serológicamente con Carnation Latent Virus (CLV).

a) Potyvirus Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV).

Dentro de los *Potyvirus* se ha detectado el *Onionyellow dwarf virus* (OYDV) en ajo y en cebolla, que probablemente sea el virus más importante del complejo debido a los graves daños que causa en la producción. El OYDV se encuentra ampliamente distribuido, se han detectado niveles de infección del 52% en plantas provenientes de Europa y del 86% de Asia. En la Argentina, el OYDV fue reportado en cebolla y ajo. Actualmente es poco frecuente en cebolla, pero en ajo está muy difundido, infectando todas las áreas productoras del país en porcentajes que varían entre el 33 y 100%. (Conci, 1997).

b) Leek Yellow Stripe Virus (LYSV)

Ha sido detectado en todos los países donde se han estudiado los virus de ajo. En nuestro país fue encontrado en ajo y en puerro y se identificaron 7 especies de pulgones como vectores, su presencia ha sido confirmada en todas las regiones productoras del país (Martínez, 1995).

2.8 Biotecnología vegetal.

Es el área de la ciencia y tecnología que utiliza organismos vivos o algunas de sus partes constituyentes, para generar organismos modificados o productos derivados con utilidad clínica, alimentaria y/o industrial. Tiene como objetivo principal el aumento de la productividad de los vegetales, lo cual es indispensable para la lograr un incremento en la producción de alimentos y otros productos producidos por las plantas. Las investigaciones se centran en producciones superiores, valor nutritivo más elevado, plantas más resistentes a las condiciones ambientales, plantas resistentes a plagas y enfermedades, conservación de la diversidad de las especies (Mendoza, 2007).

De gran importancia para el ajo, es el desarrollo y la aplicación de la biotecnología, que permite establecer un programa de saneamiento, que tiene como objetivo la obtención de plantas libres de patógenos y la posterior propagación *in vitro* de las mismas para aumentar el número de individuos a partir de un explante inicial. La micropropagación de plantas es sin dudas la más popular de las aplicaciones del cultivo *in vitro*, sus bases se establecieron desde los años 50 y 60, pero no fue hasta la década del 70, en que se estableció una verdadera industria (Kitto, 1997). Esta técnica, ha trascendido de forma exitosa de los experimentos a nivel de laboratorio a la aplicación práctica, es muy valiosa en plantas con una producción pobre de propágulos, así como una propagación vegetativa insuficiente (Jiménez, 1998).

2.8.1 Establecimiento de cultivos *in vitro*.

Consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas, químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco, logrando de esta forma desarrollarse en condiciones artificiales y asépticas (Bonga, 1982).

Según, Rosell y Villalobos, (1990).El cultivo de tejidos vegetales tiene dos aspectos fundamentales que son:

1. El aislamiento de fragmentos de tejidos u órganos (explantes) de una planta completa.
2. Proveer a estos explantes, de un medio ambiente apropiado que permita expresar su capacidad morfogénica

Al respecto Hartmann y Kester, (1995) indican que el cultivo de tejidos está enfocado especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades, propagación masiva de algunas especies de interés económico y biológico, cultivo de diversos órganos, y tejidos como (meristemos, callos, óvulos, anteras y protoplastos) así como la fusión de los últimos y la regeneración de plantas a partir de éstos, lo cual permite realizar estudios de diferentes fenómenos morfogénéticos que por otros medios serían imposibles de realizar.

Aun cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos, importantes antecedentes se remontan a los años 1838 y 1839, en que los biólogos alemanes Shleiden y Schwann, dejaban implícitamente el concepto de **totipotencia** de las células, a través de la teoría celular, la cual explicaba la complejidad de los organismos celulares sugiriendo que cada célula es una unidad independiente capaz de formar un organismo completo si se le pone en condiciones favorables (Smith, 1992). Todas las técnicas del cultivo *in vitro* se sustentan en el principio de la totipotencia, la cual establece que, las células son autosuficientes y que en principio son capaces de regenerar una planta completa (Schwann, 1838; citado por Pierik, 1990).

2.8.2 Cultivo de meristemos.

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido, abarcando además, el cultivo aséptico de células y órganos, por lo tanto, el término cultivo de tejidos *in vitro* comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva asépticamente en un medio químicamente definido y bajo condiciones ambientales controladas (Jiménez, 1998).

Constituye dentro de la biotecnología, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones según diferentes autores (Jiménez, 1998) son:

- Saneamiento y micropropagación de plantas con interés económico y comercial.
- Mejoramiento genético.
- Conservación e intercambio de germoplasma.
- Obtención de haploides y líneas isogénicas.
- Producción de metabolitos secundarios.

- Crioconservación.
- Cultivo de células y protoplastos.
- Semilla artificial.
- Ingeniería genética.

Al respecto Hurtado y Merino (1991), afirman que la aplicación de cultivo de tejidos vegetales en diferentes áreas de la investigación, se enfocó especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades, propagación masiva de algunas especies de interés económico y biológico, cultivo de diversos órganos y tejidos como meristemos, callo, óvulo, ovarios, anteras y protoplastos, así como la fusión de los últimos y la regeneración de plantas a partir de estos.

Darías (1993), señala que la técnica de cultivo de meristemos, es fundamental por el hecho de que, la distribución de los virus en los tejidos de las plantas infectadas no es uniforme, y su concentración tienden a disminuir progresivamente hacia el ápice de tallo por lo tanto, las probabilidades de que en las células del meristemo apical, se encuentre un menor número de partículas virales o estén libres de estas son mayores, que en los tejidos más diferenciados de las plantas. Es por ello que el cultivo de meristemos o ápices, es una técnica ampliamente utilizada en la obtención de plantas libres de enfermedades, conservación de germoplasma y en la propagación de semilla de alta calidad.

Pérez (1998), sugiere como tamaño óptimo de meristemo entre 0.2 y 1 mm, pero realmente el tamaño a utilizar está en dependencia de los objetivos que se persigan. El tamaño de los meristemos es directamente proporcional a su regeneración y crecimiento posterior *in vitro*, en la medida que se aumenta el tamaño, se incrementa los valores de regeneración, pero su relación con la tasa de sanidad es inversa. De forma general el riesgo de aparición de patógenos en los tejidos vegetales aumenta con el incremento de tamaño de los explantes iniciales, sin embargo en estudios comparativos con tres tamaños de meristemos, para el saneamiento al virus del enrollamiento de la hoja en papa (PRLV). no se puso de manifiesto esta relación, cuando se trabajo con un tamaño de 0.9 a 1.5 mm.

2.8.2.1 Tejidos meristemáticos.

(Del griego meristos= divisible) Llamados también tejidos de formación (forman tejidos adultos o definitivos) o embrionarios por que la primera célula meristemática es la célula huevo o cigoto que por divisiones sucesivas forman nuevas células y luego el embrión. Las células meristemáticas se caracterizan por ser de tamaño reducido, izodiametrales, de pared primaria muy delgada abundante citoplasma y núcleo grande. Presentan plastidios en forma de protoplastidios. Tienen ausencia de inclusiones ergásticas. Sus vacuolas están en formación "vacuoma"; Mientras más grande es la célula meristemática mayor el número de vacuolas. (Rodríguez, 1983).

Según Conci (1993), la razón principal por la cual las células meristemáticas son indemnes a los virus es que el meristemo carece de tejidos vasculares, los virus son rápidamente transportados a lo largo de toda la planta por el floema y así se distribuyen sistémicamente. Los meristemas no tienen tejido vascular formado, por lo tanto, el avance es solamente a través del movimiento célula a célula.

De acuerdo a Conci (1993), existen otros factores como ser:

- a) El meristemo apical tiene una mayor velocidad de crecimiento y en consecuencia el virus "no alcanza" al meristemo.
- b) En una célula meristemática el virus tiene mayor dificultad de acoplamiento con los ribosomas, debido a que estas células tienen un código de trabajo muy definido.
- c) Existe una competencia por uso de algunos metabolitos entre células y virus.
- d) Los virus en la planta no están uniformemente distribuidos. En las infecciones sistémicas algunos están limitados al floema o a pocas células parenquimáticas adyacentes; otros involucran a todas, o casi todas, las células de la planta.

El tamaño óptimo a utilizar se decide tomando en cuenta dos factores: tamaño óptimo para la liberación del virus y tamaño óptimo para facilitar el cultivo. Existe una mayor posibilidad de obtener plantas libres de virus si sólo se aísla el meristemo, pero la posibilidad de que el meristemo sobreviva sin primordios foliares es muy pequeña. Por otro lado, utilizar meristemas más grandes (con más primordios foliares) hace que la probabilidad de obtener plantas libres de virus sea pequeña, de manera general se puede decir que los meristemas apicales tienen más probabilidad de estar libres de virus que los meristemas

axilares, y que si los meristemos provienen de una planta en plena actividad hay mayor probabilidad de obtener plantas libres de virus (Pérez ,1998).

2.8.3 Micropropagación *in vitro*.

La palabra micropropagación, se utilizó para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación *in vitro*, y se define como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas, que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Hartmann y Kester, 1968; citado por Jiménez, 1999).

Por otro lado Jiménez (1999), señala que la técnica de micropropagación consiste en tomar células de la planta, preferiblemente meristemos, que se encuentran en las yemas apicales para luego programar esa célula para que forme tallos. Luego, multiplicar esos tallos. La micropropagación permite la reproducción de miles de plantas por metro cuadrado y tiene la ventaja de, si el ejemplar madre es sano, todas las plantas que se originen a partir de él, son sanas, ya son genéticamente similares. Esto asegura la homogeneidad de la producción. Una vez se define la cantidad de plantas que necesita, se cambia las condiciones hormonales para que forme raíz y una vez que la planta está completa y que puede absorber nutrientes por la raíz, se la traslada al invernadero.

2.9.4 Fases de la micropropagación.

2.8.4.1 Etapa preparativa.

En esta etapa se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pre - tratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y el desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*, al mismo tiempo es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micropropagación eficiente y repetible. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico, como genético (Jiménez, 1999).

a) Selección del explante.

Prácticamente se puede utilizar cualquier porción o parte de la planta; para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro* en primera instancia dicha selección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal que se trate. Generalmente, se emplean plantas sanas y vigorosas y dentro de éstas, las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemos. Las plantas jóvenes son las que aportan los explantes más reactivos, ya que la potencialidad disminuye con la edad y el tamaño del explante, es otro aspecto que se debe tener en cuenta, pues la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con su disminución (Mroginski, 1991).

La constitución genética de la planta donadora o planta madre es el principal factor relacionado con la frecuencia de variantes somaclonales resultante del proceso de propagación, por lo que debe asegurarse de que el material provenga de una adecuada selección clonal en un estado de crecimiento activo, vigoroso y sano (Darías, 1993).

También la edad fisiológica del explante influye en la morfogénesis, mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Roca y Mroginski, 1991).

2.8.4.2 Etapa de establecimiento.

La función de esta fase es establecer un explante estéril en un medio de cultivo, entre los factores que pueden afectar al establecimiento está, la selección del explante, eliminación de la contaminación, y las condiciones del medio nutritivo (Hartmann y Kester, 1995).

En general ocurre primero un aumento del tamaño y luego el tejido puede ir adquiriendo lentamente pigmentación verde. Posteriormente irán desarrollándose brotes o plantas completas a partir de las cuales pueden obtenerse yemas axilares (Conci, 1993).

a) Explante.

Se puede utilizar gran variedad de explantes para el establecimiento *in vitro*, pero los meristemos apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies (Roca y Mroginski, 1991).

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de *novo*) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación, basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante (Olmos, 1993).

b) Desinfección del explante.

La contaminación por microorganismos provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos. Existen formas para controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que lo inducen (Alvarado *et al.*, 1998).

Diversos compuestos químicos se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes, se emplean con mayor frecuencia el etanol (70 % v/v) y el hipoclorito de sodio (1-3 % v/v) y con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio (6-12 % v/v) y el bicloruro de mercurio (0.1-1.25 % v/v), aunque con este compuesto por lo general se obtienen mejores resultados, es altamente tóxico y no se remueve con facilidad del explante. Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween 20 para reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante (Margara, 1988; Jiménez, 1998).

Los desinfectantes más usados son el hipoclorito de sodio (NaClO) hipoclorito de calcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). Los tres primeros se emplean en una concentración de 1 a 3 % (v/v) en tiempos de 10 a 20 minutos, el etanol se usa por lo general al 70% (v/v) durante 30 segundos (Jiménez, 1999).

No obstante, las concentraciones del agente esterilizante y la duración, se deben escoger en función de minimizar los daños para los explantes, y se debe tener en

cuenta la especie vegetal y tipo de explante, ya que no existe un procedimiento único (Margara, 1988; Roca, 1991; Mroginski, 1991).

Después de aplicar los desinfectantes, los explantes se deben enjuagar varias veces con agua destilada estéril (Jiménez, 1999).

Según Serrano (1993), una vez desinfectado el material vegetal que se va a utilizar como fuente de explante, resulta muy importante evaluar su crecimiento posterior, ya que los vapores del cloro pueden afectar las capas celulares externas y necrosarlas porque penetran profundamente y, aunque por lo general, se obtiene una buena desinfección, también pueden afectar los tejidos internos y darse el caso que el tratamiento utilizado para la desinfección del explante sea efectivo, pero afecte el crecimiento del explante.

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio (Olmos, 1993).

2.8.4.3 Etapa de multiplicación.

Es la etapa de producción del mayor número posible de propágulos a partir de los explantes establecidos. Se induce la proliferación de brotes que son separados y cultivados en medios frescos para inducir nuevos brotes, hasta lograr el número de plantas deseado (Jiménez, 1999).

El método de proliferación de yemas adventicias y axilares es más favorable debido a que ofrece alta proporción en la producción de clones genéticamente uniformes. Plantas de ajo cultivadas por medio del cultivo de callos, son generalmente heterogéneas a causa de la inestabilidad genética de las células de callos en cultivos de largo periodo (Bhojwani, 1980).

De acuerdo con Olmos (1993), el objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación

somaclonal. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos. Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica. La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

2.8.4.4 Etapa de microbulbificación.

La propagación *in vitro* del ajo se realiza por vitroplantas y microbulbos. Este último proporciona un medio ideal para producir y conservar material limpio, que puede permitir el inicio de programas de producción de "semillas" certificadas (Pateña *et al.*, 1998). No obstante, el éxito en la bulbificación, depende altamente de la concentración de los reguladores de crecimiento, y de sacarosa, lo que implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos (Mohamed *et al.*, 1995).

La principal variación en los medios de bulbificación es el aumento en la concentración de sacarosa, de esta forma se aumenta el estrés hídrico por aumento del potencial osmótico del medio de cultivo, este estrés induce el proceso de microbulbificación (Quezada, 1999).

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

posteriormente en zonas aisladas para evitar la reinfección de los materiales en poco tiempo.

De acuerdo con Racca (1989), la microbulbificación *in vitro* de cultivares promisorios constituye un avance tecnológico que no solo facilita la transferencia a tierra de los materiales micropropagados sino también es útil en los intercambios de germoplasma. Los microbulbillos son estructuras viables, inducidas *in vitro*, bajo estrés fisiológico o mediante el uso de reguladores de crecimiento.

2.9 Medio nutritivo de cultivo.

Según Terán (1997); las plantas para su crecimiento y desarrollo, necesitan tomar del suelo cantidades importantes de macro y micro nutrientes. Los medios de cultivo de tejidos vegetales y células vegetales, contiene estos elementos, pero además poseen fuentes de carbono, vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento.

El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales en proporción y dosis específicas (Smith, 1992). Su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como del pH del medio y del agente solidificante (Margara, 1988).

Para el cultivo de meristemas y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio MS basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*. También se han empleado pero con menor frecuencia el Wh (White, 1943), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), BDS (Dunstan y Short, 1977) citados por Mroginski (1991).

Pérez (1998), menciona que el empleo de sustancias químicas con calidad no reactivo como componente de los medios de cultivo, ha sido investigado por varios autores entre ellos Orellana (1995), realizó trabajos en la micropropagación de bananos, caña de azúcar y papa, sustituyendo el nitrato de potasio (KNO_3), nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), los cuales no afectaron el desarrollo de los explantes ni el coeficiente de proliferación durante la multiplicación ni el desarrollo de las vitroplantas y raíces, permitiendo una notable reducción de los costos de las vitroplantas ya que el costo de estas sustancias permitió bajar el 80% del costo de los de calidad reactivo.

Los reguladores del crecimiento en pequeñas cantidades aumentan, inhiben o modifican de una u otra forma cualquier proceso fisiológico del vegetal (Pérez, 1994). Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable a la segunda, se favorece la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Smith, 1992; Dixon, 1994).

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada, se utilizan en el medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0.03-30 mg/L y se ha demostrado su efecto en el crecimiento y morfogénesis *in vitro* (Mroginski, 1991; Dixon, 1994).

Al contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos que se emplean como material inicial para el cultivo *in vitro*, son los lugares de síntesis, se adicionan al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0.001- 10 mg/L (Jiménez, 1998). También se han empleado en los medios de cultivo las giberelinas (GA₃), ácido abscísico, etileno (Mroginski, 1991) y con mayor frecuencia los brasinoesteroides y oligosacarinas, que ejercen una acción similar o superior a los reguladores del crecimiento tradicionales, y además, tienen la ventaja que se adicionan en los medios de cultivo en bajas concentraciones (Núñez, 1996; Rodríguez *et al.*, 1996; Cabrera *et al.*, 1998).

Mejía (1988), menciona que la mayoría de los medios de cultivo contienen aparte de las sales minerales; una o más clases de vitaminas, reguladores de crecimiento, aminoácidos como estimuladores de crecimiento y, para darle a la planta una buena estructura, debe poseer una fuente de energía como la sacarosa y un agente solidificante como el agar.

2.9.1 Sales inorgánicas

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente de compuestos inorgánicos, además del carbono, hidrógeno y oxígeno (Rosell, 1990).

Las plantas necesitan tomar del medio cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos que son los macronutrientes, éstos son indispensables para el crecimiento de la planta y están constituidos por nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio, azufre, cloro y sodio (Mejia, 1988).

Al mismo tiempo, para una adecuada actividad metabólica, las células requieren de micronutrientes, los más esenciales son: Hierro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre, Cobalto y Molibdeno (Rosell y Villalobos, 1990).

2.9.2 Compuestos orgánicos

a) Hidratos de carbono.

Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos. La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2 - 4%. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructuosa, almidón, lactosa, maltosa sorbitol, manitol y galactosa en otras especies; pero esos compuestos son inferiores a la sacarosa como fuente de carbono. La sacarosa puede ser sustituida por azúcar refinada que también genera óptimos resultados (Gómez, 2002).

b) Hormonas o reguladores de crecimiento.

Se utilizan propiamente cuatro grupos de reguladores de crecimiento: auxinas, citocininas, giberelinas y ácido abscísico. En algunos casos se utiliza el etileno (Gómez, 2002).

- **Auxinas.**

Son un grupo de sustancias que controlan el crecimiento de las plantas (a menudo llamadas hormonas vegetales o fitohormonas). Juegan un papel esencial en la coordinación de la mayoría de procesos de crecimiento de la vida de la planta, en especial en los relacionados con los tallos. Las auxinas determinan el crecimiento de la planta por alargamiento de sus células, en todos los niveles, desde las células, los

órganos y la planta entera. Su representante más abundante en la naturaleza es el ácido indolacético (IAA), derivado del aminoácido triptófano. El precursor de la forma activa de auxina, el ácido indolacético (AIA) proviene del aminoácido L-triptófano; el grupo indol permanece constante, pero para alcanzar la forma de ácido indol-acético debe sufrir una descarboxilación y una desaminación. Esto puede ocurrir por dos vías. La primera se da en todas las plantas superiores; el L-Triptófano transfiere su grupo amino a una molécula de 2-oxoglutarato, dando glutamato e indol-piruvato. El indol-piruvato es una molécula muy inestable que no tarda en descarboxilarse. El producto de esta hormona es el crecimiento (Wikipedia, 2007).

Según Gómez (2002); las auxinas se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Tienen movimiento basipétalo (descendente), estimula la división celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias. Promueve el enraizamiento, tiene efecto en la síntesis de enzimas del ARN, de proteínas y en la permeabilidad celular. La actividad de las auxinas en el medio es degradada por las bacterias. Las más conocidas son:

Acido 3-indolacético.....	AIA (Muy termolábil)
Acido 3-indolbutírico.....	AIB
Acido naftalenácético.....	ANA.
Acido 4-clorofenoxiacético.....	CPA.
Acido 2,4-diclorofenoxiacético.....	2,4-D
Acido 3,6-dicloro-2-metoxibenzóico.....	Dicamba
Acido 2,4,5 triclorofenoxiacético.....	2,4,5-T
Acido 4 amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico.....	Picloram

La concentración de auxinas utilizadas varía desde 0.1-10 mg/l, siendo el rango más empleado el comprendido entre 0.25 - 3 mg/L. La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la siguiente manera: 2,4-D > ANA > AIB > AIA. Las posibles respuestas al tratamiento con auxinas son la estimulación de la producción de callos y crecimiento celular, iniciación de tallos y particularmente raíces, inducción de embriogénesis somática, estimulación del crecimiento de ápices y meristemas (Gómez, 2002).

- **Citocininas**

Fueron descubiertas en la década de 1950 como factores que promueven la proliferación celular y mantienen el crecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Poco después de su descubrimiento Skoog y Miller propusieron que la formación de órganos en las plantas se debe al balance existente entre las citoquininas y las auxinas. Usando cultivos de tabaco, demostraron que un balance alto de auxinas favorecía la formación de raíces mientras que un balance alto de citoquininas favorecía la formación de tallos. Aparte de su papel como reguladores de la formación de nuevos órganos, las citoquininas también intervienen en la apertura de estomas, supresión de la dominancia apical e inhibición de la senescencia de las hojas entre otros procesos. En la célula las citoquininas, en conjunción con las auxinas, controlan el ciclo celular de las células vegetales. Concretamente, las citoquininas regulan la entrada de la célula en la fase G₁ tras la mitosis, es decir, determinan el comienzo de un nuevo ciclo al promover la acumulación de ciclinas tipo D, que se unen a kinasas dependientes de ciclinas G₁. También controlan la transición entre las fases G₂/M, el último punto de control antes del comienzo de la mitosis. Las citoquininas regulan también la síntesis de pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos junto con otros factores como la luz y el estado nutricional de la célula (Wikipedia, 2007).

Según Gómez, (2002); las raíces son el principal centro para la biosíntesis y son trastocadas hacia los brotes y hojas (movimiento acropétalo o ascendente). Son muy importantes por que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis, inducción en la formación de tallos y proliferación de yemas axilares, inhibición de la formación de raíces. Son derivadas de la adenina y dentro de este grupo están:

- N⁶ Bencil aminopurina.....BAP.
- N⁶ Dimetilalil aminopurina.....2iP.
- N⁶ Furfuril aminopurina.....Kinetina.
- N⁶ (4-hidroxi, 3-metil, 2-butenil) adenina.....Zeatina.

La interacción auxina / citocinina influye sobre el tipo de morfogénesis que ocurrirá en el cultivo de tejidos vegetales dependiendo en gran medida de la relación y las concentraciones de auxinas y citocininas presentes en el medio (Gómez, 2002).

- **Giberelinas.**

Estimula el crecimiento del tallo de las plantas mediante la estimulación de la división y elongación celular, regulan la transición de la fase juvenil a la fase adulta, influyen en la iniciación floral, y en la formación de flores unisexuales en algunas especies; promueven el establecimiento y crecimiento del fruto, en casos de que las auxinas no aumentan el crecimiento, promueven la germinación de las semillas (ruptura de la dormición) y la producción de enzimas hidrolíticas durante la germinación. Las GAs son activas y producen respuesta a concentraciones extremadamente bajas. Las giberelinas incrementan tanto la división como la elongación celular (incrementa el número de células y la longitud de las mismas). Inducen el crecimiento a través de una alteración de la distribución de calcio en los tejidos. Las giberelinas activan genes que sintetizan ARNm, el cual favorece la síntesis de enzimas hidrolíticos, como la α -amilasa, que desdobra el almidón en azúcares, dando así alimento al organismo vegetal, y por tanto, haciendo que incremente su longitud. Las GAs regulan el ciclo celular en los meristemas intercalares, se produce la elongación celular y luego la división celular, estando este efecto mediado por una proteína kinasa dependiente de ciclina (Wikipedia, 2007).

En plantas son sintetizadas en puntos de crecimiento como embriones, meristemas o tejidos en desarrollo. En la naturaleza existen muchas y se las denomina Giberelina GA₁, GA₂.....GA₄₀. Muchas se han sintetizado, pero solo dos o tres se encuentran disponibles en el mercado. El ácido giberélico GA₃ es el más frecuentemente empleado en el cultivo *in vitro*. Tienen efectos similares a las auxinas, pero su distribución no es polar, además trabajan en los puntos donde las auxinas son inefectivas o inhibidas y viceversa. Sustancias como Cloromequat (CCC), Carvadan y Ancimidol son conocidos como antigiberélicos (Gómez, 2002).

- **Acido abscísico**

El ácido abscísico o ABA es una hormona vegetal cuyo precursor es el isopentenil difosfato. Este derivado carotenoide tiene dos isómeros cis y trans, interconvertibles entre ellos en la planta; y dos enantiómeros R-S que no son interconvertibles. La funcionalidad de esta hormona recae sobre la cadena lateral de cinco carbonos. Se sintetiza en los plastidios, fundamentalmente en los cloroplastos. Esta hormona vegetal se puede regular por degradación, conjugación, transporte (Wikipedia, 2007).

En las plantas es sintetizado en los plastidios y cloroplastos. Se utiliza en casos muy especiales. Estimula la sincronización durante la embriogénesis en ciertos cultivos, así como inhibe el crecimiento, bloqueando el efecto de las auxinas y giberelinas; promueve el estado de dormancia, inhibe la síntesis del ARN, pero no la del ADN y promueve el desarrollo de los estomas. La concentración empleada es de 0.01 - 0.2 mg/L. (Gómez, 2002).

c) Vitaminas.

Según Olmos, (1998); las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, forman parte de un grupo de compuestos orgánicos esenciales en el metabolismo y necesarios para el crecimiento celular y, en general, para el buen funcionamiento del organismo vegetal. Las vitaminas más empleadas son:

- **Tiamina** (Vitamina B1) se añade como tiamina-HCl en cantidades que varían de 0.1 a 30 mg/l. Esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de células vegetales. Al respecto Gómez (2008), indica que, el extracto de quinua es utilizado en el cultivo de tejidos por su contenido alto en tiamina (0.840mg), esta vitamina aporta metabolitos esenciales para el desarrollo fisiológico y metabólico de las vitroplantas.
- **Ácido nicotínico** (Niacina).
- **Piridoxina** (Vitamina B6): se añade como piridoxina-HCl.
- **Mio-inositol**: no es propiamente una vitamina, sino un azúcar-alcohol. Tiene un efecto estimulante sobre la morfogénesis, participando probablemente en la vía biosintética del ácido galacturónico.

- **Ácido pantoténico:** ayuda al crecimiento y regeneración de tejidos.
- **Ácido fólico:** disminuye la proliferación de tejido en la oscuridad, mientras que en la luz la aumenta, esto es debido a que en presencia de luz, es hidrolizado a ácido P-aminobenzoico.
- **Riboflavina:** es inhibidor del crecimiento de raíces.
- **Vitamina E:** ayuda a la formación de callos que provienen de embriones, y en cultivos en suspensión, ayuda a la viabilidad de células.

d) Aminoácidos

Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio de cultivo. Los aminoácidos también pueden actuar como agentes quelantes. A continuación se indican las funciones principales de los aminoácidos en sistemas in vitro. La glutamina y asparagina son transportadores de nitrógeno; L-arginina estimula raíces; L-serina es empleada en cultivo de microsporas y L-cisteína es un agente reductor (Rosell y Villalobos, 1990).

e) Materiales inertes de soporte.

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte, para la preparación de medios sólidos o semisólidos, éste presenta las siguientes ventajas:

- Con agua el agar forma geles que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C, es decir que es un gel estable a todas las temperaturas de incubación.
- No es alterado por enzimas vegetales.
- No reacciona con los constituyentes del medio.
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio (Rosell y Villalobos, 1990).

Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, ya que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento. La concentración de estas sustancias está determinada por la calidad del agar. La concentración usual de agar que se utiliza es de 6 a 9 g/L medio sólido y de 2 a 4 g/L medio semisólido (Darías, 1993).

Algunos factores como la concentración demasiado elevada de agar, y el tipo, pueden afectar de forma negativa al crecimiento y desarrollo *in vitro* (Pierik, 1990). Terrón (1988), señalan que efectivamente el agar inhibe el crecimiento de algunos tejidos debido a que ofrece una aireación insuficiente.

f) Agua.

La calidad del agua es importante ya que constituye el 95% del medio nutritivo, se recomienda utilizarla destilada o desionizada (Pierik, 1990).

El agua corriente apta para el consumo humano no es lo adecuadamente pura para el cultivo de plántulas debido a que presenta un alto contenido de minerales, aceites, óxidos metálicos, productos corrosivos, microorganismos, material orgánico y sales disueltas (Rosell y Villalobos, 1990)

3. LOCALIZACIÓN

3.1. Ubicación geográfica.

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Nucleares (CIN – Viacha), dependiente del Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN), el cual se encuentra ubicado a 3858 msnm. a 3 Km de la ciudad de Viacha y 32 Km. de la ciudad de La Paz. Pertenece a la jurisdicción de la primera sección de la provincia Ingavi dependiente del municipio de Viacha en el departamento de La Paz. Geográficamente se ubica entre los paralelos 16°39'25" latitud Sur, y 68°18'51" longitud Oeste.

3.1.1 Características climáticas.

Esta zona se caracteriza por presentar una temperatura promedio anual de 10 °C y una precipitación pluvial anual de 542 mm la humedad ambiental es de 57.8%. Su clima es considerado semiárido las especies nativas predominantes en el área son *kiswara*, *thola* y *estipa*, con suelos de carácter franco limoso – arcilloso.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Materiales.

4.1.1 Material vegetal.

Se utilizaron caulobulbillos (dientes de ajo) provenientes de los ecotipos Colorado de Mendoza o ajo tarijeño y el ecotipo cochabambino Rosado de Italia, ambos debidamente certificados por las oficinas regionales de semillas en un número de cuarenta bulbos por ecotipo en estado de latencia.

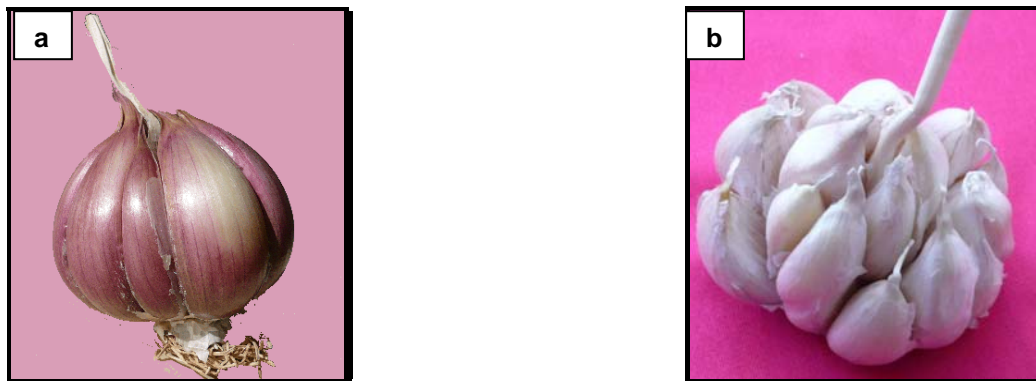


Figura 1. Ecotipos de ajo en estudio, Colorado de Mendoza (a) y Rosado de Italia (b).

Fuente: Propia, 2008.

A continuación en el cuadro 1, se destacan algunos aspectos concernientes a los ecotipos en estudio.

Cuadro 1. Características más representativas de los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.

Ecotipo.	Ciclo vegetativo (días)	Sabor	Olor	Color del bulbo	Forma del bulbo	Número de dientes / bulbo (Promedio)
Colorado de Mendoza	220 (Tardío)	Picante	Fuerte	Colorado a rojizo	Redondo y bien formado	9
Rosado de Italia	157 (Corto)	Picante	Medio	Rosado a blanco	Ensanchado y eclosionado	12

Fuente: Propia, 2008.

4.1.2 Equipos de laboratorio.

- Agitador eléctrico magnético.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Cámara de flujo laminar de aire.
- Cámara germinadora.
- Horno microondas.
- pH metro.
- Refrigerador.
- Temporizador (Control de horas luz - oscuridad).
- Termómetro de máximas y mínimas.

4.1.3 Material de vidrio.

- Frascos de cultivo ("Gerber" 90 x 45 cm.).
- Frascos de vidrio para almacenar soluciones (250, 500 ml).
- Matraces erlenmeyer (250, 500 ml)
- Pipetas graduadas (4, 10 y 25 ml.).

- Placas petri.
- Probetas (500, 1000 ml.).
- Tubos de cultivo (9,7 x 1,5 y 14,7 x 2 cm.).
- Vasos de precipitación (75, 100 y 1000 ml)

4.1.4 Material químico.

4.1.4.1 Medios de cultivo.

- Sales nutritivas de Murashige y Skoog (1962). (Medios de cultivo. Anexo 1)
- Sales comerciales (Murashige y Skoog modificado). (Medio de cultivo. Anexo 2)

4.1.4.2 Reactivos.

- Acido 3-indolacético (AIA)
- Acido clorhídrico (HCL 0,1 y 1 N)
- Agar-Agar.
- Hidróxido de sodio (Na OH 0,1 y 1 N)
- N⁶ Furfuril aminopurina. (Kinetina)
- Nitrato de amonio.(NH₄ NO₃)
- Nitrato de potasio.(KNO₃)
- Sacarosa.
- Sulfato de magnesio(Mg SO₄)

4.1.5 Material de desinfección y asepsia.

- Agua destilada esterilizada.
- Alcohol etílico.
- Formol.
- Hipoclorito de sodio.
- Jabón antifúngico.
- Lavandina.

4.1.6 Instrumentos e implementos de laboratorio.

- Algodón.
- Bisturí.
- Mechero de alcohol.
- Papel aluminio.
- Pinzas.
- Plástico (Diamond - Plástic Wrap Glad)
- Pro pipeta.
- Tijeras.

4.2 Metodología.

La etapa inicial estuvo comprendida por varios experimentos preliminares, así como la preparación y adecuación del laboratorio, instrumental y el material vegetal para posteriormente dividir la investigación en tres etapas de estudio:

- 1º Establecimiento.
- 2º Multiplicación.
- 3º Microbulbificación.

4.2.1 Ambiente de trabajo.

El Centro de Investigaciones Nucleares (CIN – Viacha), cuenta con un laboratorio de Biotecnología Vegetal dividido en los siguientes ambientes:

a) Área de lavado y preparación de medios.

En este ambiente se procedió al lavado de todo el instrumental y material de vidrio necesario para la investigación, el detergente líquido es el más recomendado por tener un menor efecto residual (Peróxidos) sobre el material de laboratorio además de la eficiencia en la eliminación de partículas y la facilidad de enjuague, el mismo se realizó en múltiples sesiones de agua limpia y finalmente con agua destilada tibia.

La preparación de medios para el cultivo *in vitro*, conlleva diferentes aspectos, desde, la utilización de soluciones stock, el pesado de los reactivos, el ajuste del medio de cultivo, la distribución del medio en los tubos de ensayo, y finalmente el sellado de los tubos con papel aluminio. De la misma forma, la preparación del material de apoyo exige ciertas normas de importancia, como ser: la cobertura del instrumental metálico con papel aluminio (en las puntas), recipientes con agua destilada, placas petri cubiertas con papel sábana. Todo este procedimiento se realizó en el área de preparación de medios.

b) Área de esterilización.

Este ambiente cuenta con equipos específicos para la esterilización, uno de ellos es el autoclave, aparato que sirve para esterilizar objetos y sustancias situados en su interior, por medio de vapor y altas temperaturas. Una vez ya preparados los medios de cultivo y material de apoyo, se procedió a la esterilización a una temperatura de 121 °C, a una presión de 15 lb/pulg², durante 15 minutos, para después de 24 hrs. ser utilizados en la sala de siembra y transferencia.

c) Área de siembra y transferencia de explantes.

Este ambiente reúne las condiciones necesarias para la transferencia y siembra de explantes en forma aséptica, condiciones proporcionadas por la cámara de flujo laminar, donde 24 hrs antes se realizó una limpieza minuciosa con hipoclorito de sodio (lavandina) al 3% (v/v) y alcohol al 70% (v/v) con la finalidad de eliminar cualquier elemento contaminante.

d) Sala de crecimiento.

Este ambiente reúne las condiciones adecuadas para el desarrollo de las vitroplantas, cuenta con estantes metálicos a los que se adaptaron tubos fluorescentes blancos de 40 y 60 W, que proveen una intensidad lumínica aproximada de 1200 lux (lumen por metro cuadrado) y una temperatura de 22 a 25 °C, el fotoperiodo de 16/8 horas de luz / oscuridad debidamente controladas por un temporizador automático, todos estos datos fueron tomados durante los seis meses de investigación.

4.3 Fase 0. Selección y tratamiento del material vegetal.

Se seleccionaron bulbos con buena presencia (tamaño, estructura, color, forma) teniendo en cuenta que no presenten signos de enfermedades fúngicas o daños mecánicos, para después ser sometidos a múltiples lavados en agua destilada, eliminando de esta forma los exudados y residuos procedentes de campo. Posteriormente se procedió a disgregar el bulbo, separando los dientes uno por uno, estos presentaron un índice visual de superación de dormancia (I.V.D) mayor al 40%, (este valor indica la alta vitalidad del explante) posteriormente fueron almacenados en la cámara de germinación a una temperatura constante de 20 °C por el lapso de 7 días asegurando la ruptura del estado de dormancia.



Figura 2. Bulbo(a) y diente de ajo (b), con apropiadas características para la introducción *in vitro*.

Fuente: Propia, 2008.

4.3.1 Fase I. Etapa de establecimiento.

4.3.1.1 Desinfección del material vegetal.

Los dientes o bulbillos fueron seccionados por la mitad (corte transversal) eliminando las catáfilas de protección externa, el disco basal inferior, y la mitad superior del explante.

Posteriormente se procedió a efectuar el protocolo de desinfección externa donde se utilizó alcohol etílico al 70% (v/v) durante 30 a 45 segundos, a continuación se procedió a la inmersión en hipoclorito de sodio al 2.5 % (v/v) durante un tiempo de 15 a 20 minutos, para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio se realizó tres enjuagues consecutivos con agua esterilizada. Todo este procedimiento fue realizado en condiciones asépticas, proporcionadas por la cámara de flujo laminar y además atomizando el ambiente con una solución de alcohol al 70%.

Con la ayuda de una pinza y el bisturí los meristemas fueron extraídos asépticamente en la cámara de flujo laminar para después ser introducidos a razón de un explante por tubo de ensayo en 2 ml medio nutritivo "MS" (Murashige y Skoog, 1962), más la acción de sacarosa 30g/L y agar 6.5 g/L. A continuación los tubos fueron sellados con plastifilm y llevados a la sala de crecimiento a una temperatura constante de 25°C y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, durante 6 semanas. A los 7 días de sembrados los meristemas se realizó la toma de datos de cada una de las muestras.



Figura 3. Meristemo apical de ajo (de 1 mm) visto en el estereoscopio (400 x).

Fuente: Propia, 2008.

4.3.1.2 Análisis estadístico.

Para la fase de establecimiento se realizó un análisis estadístico descriptivo de 40 vitroplantas escogidas al azar, por cada ecotipo en estudio, donde se analizó la Media aritmética, Varianza, Desvió estándar, Coeficiente de variación, y Error estándar por cada variable de respuesta establecida:

4.3.1.3. Variables de respuesta.

A continuación se describen las variables de respuesta evaluadas en la etapa de establecimiento:

a) Porcentaje de contaminación (% Ct.): Se identificó el número total de vitroplantas contaminados (presencia de hongos y /o bacterias) este valor se expresó en porcentaje.



Figura 4. Explantes descartados en la etapa de establecimiento producto de malformaciones (a), y no regeneramiento (b).

Fuente: Propia, 2008.

b) Porcentaje de supervivencia (% Sv.): Se identificó el número total de vitroplantas que lograron desarrollarse, (detectando su crecimiento) este valor se expresó en porcentaje.

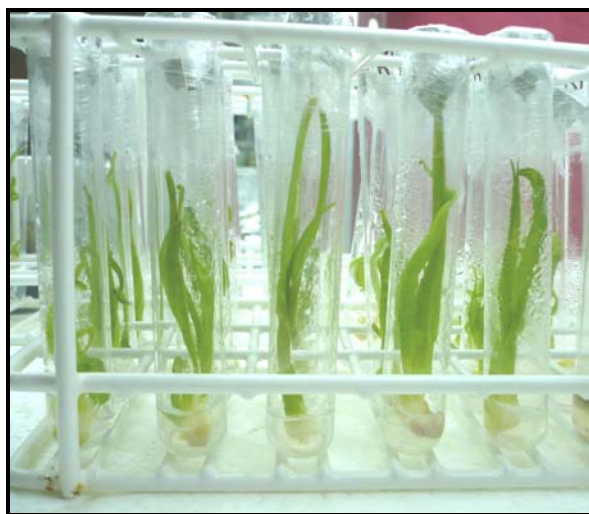


Figura 5. Vitroplantas de desarrollo óptimo a los 42 días de establecimiento.

Fuente: Propia, 2008.

- c) Altura final del explante:** Se midieron el largo de cada vitroplanta desde la base terminal (del talluelo) emergente del medio de cultivo, hasta el final de la hoja más alta.

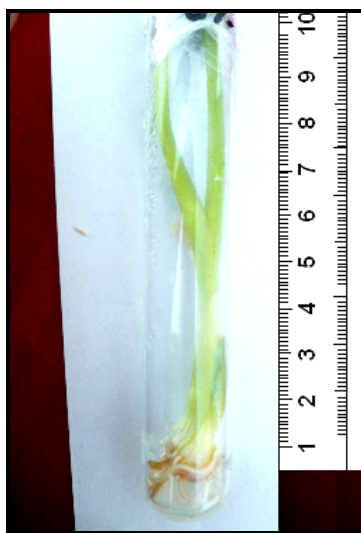


Figura 6. Altura de vitroplanta registrada a los 42 días de establecimiento.

Fuente: Propia, 2008.

- d) Número de hojas:** Se identificó cuantitativamente el número de hojas de cada vitroplanta.

4.3.2 Fase II. Etapa de multiplicación.

Luego del establecimiento e iniciado el crecimiento del explante, se seleccionaron las mejores vitroplantas descartando aquel material con señales aparentes de contaminación, escaso crecimiento, malformaciones, para luego ser transferidos a los diferentes medios de multiplicación (Anexo. 3), a razón de 1 explante por medio de cultivo.

Pasado las 6 semanas que conlleva esta etapa se identificó el número de brotes adventicios formados, teniendo el cuidado de hacer un seguimiento minucioso cada 7 días, los brotes adventicios fueron extraídos en la cámara de flujo laminar para después ser transferidos a otros medios de cultivo con las mismas características dando inicio al subcultivo o repique.

La formación de brotes adventicios responde a lo mencionado por Quezada (1999), que indica; la suministración adecuada de reguladores de crecimiento aumenta el número de subcultivos, debido al incremento en el número de brotes por explante utilizando 1mg/L de 2ip y 1mg/L de JA.

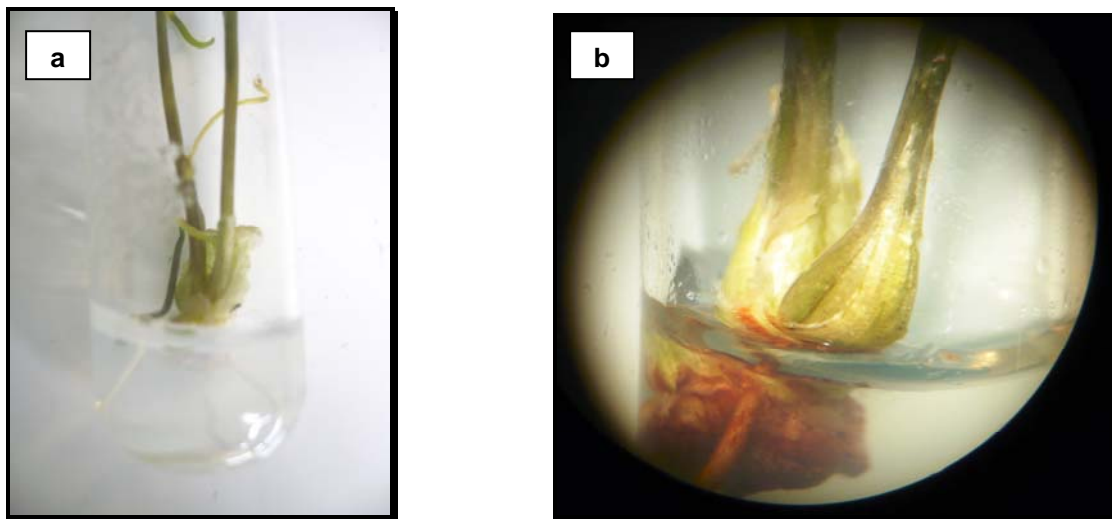


Figura 7. Formación de brotes adventicios de ajo en la etapa de multiplicación, a los 14 días (a) y a los 36 días (b) visto en el estereoscopio (400 x).

Fuente: Propia, 2008.

El N⁶ Dimetilalil aminopurina (2ip) pertenece al grupo de las citoquininas y el ácido jasmónico (JA) tiene efectos tuberificantes además de estimular el desarrollo radicular. Ambos reguladores presentan una alta eficiencia en la proliferación de brotes pero

cuentan con una desventaja su costo es alto, razón por la cual en experimentos simultáneos se reemplazó el Zip y el JA por otro tipo de reguladores con la misma naturaleza pero de costo más accesible donde el número de brotes por vitroplanta aumento satisfactoriamente.

4.3.2.1 Diseño experimental.

Para la fase de multiplicación se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con 10 repeticiones por tratamiento, donde los factores de estudio fueron los ecotipos (Colorado de Mendoza y Rosado de Italia), y la variación de medios nutritivos descritos de la siguiente manera:

Factor A: Ecotipos

a1 = Colorado de Mendoza.
a2 = Rosado de Italia.

Factor B: Medios nutritivos de multiplicación (MnM.)

b1 = Ms = MS (*)
b2 = MsM = MSM (**)
b3 = MsM + EQ = MSM + Vitaminas (extracto quinua)
b4 = Ms + EQ = MS + Vitaminas (extracto quinua)

MS (*) = Sales de Murashige & Skoog con vitaminas sintéticas (Anexo 1.)

MSM (**) = Sales de Murashige & Skoog Modificado
(Sustitución de KNO_3 , $MgSO_4$, NH_4NO_3 . Anexo 2.)

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la etapa de multiplicación.

	Factor A: Ecotipos	
	Colorado de Mendoza	Rosado de Italia
Factor B: Medios de multiplicación.	$T_1 = a1\ b1$	$T_5 = a2\ b1$
	$T_2 = a1\ b2$	$T_6 = a2\ b2$
	$T_3 = a1\ b3$	$T_7 = a2\ b3$
	$T_4 = a1\ b4$	$T_8 = a2\ b4$

4.3.2.2 Variables de respuesta.

A continuación se describe las variables de respuesta evaluadas en la etapa de multiplicación.

a) Número de raíces: Se identificó cuantitativamente al finalizar la etapa, es decir después de los 42 días de la siembra del explante.

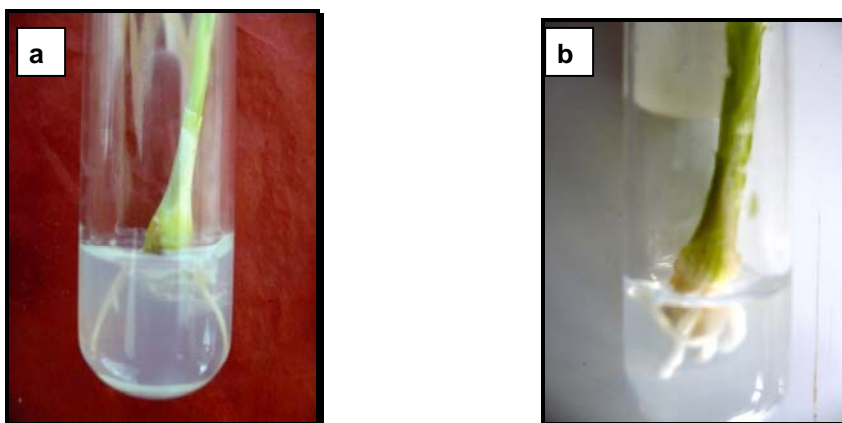


Figura 8. Formación de raíces en el ecotipo Colorado de Mendoza (a) y Rosado de Italia (b) evaluado a los 42 días.

Fuente: Propia, 2008.

b) Altura: Se tomaron mediciones cada 7 días, donde se procedió a medir el largo de la vitroplanta, desde la base terminal (del talluelo) emergente del medio de cultivo, hasta el final de la hoja más alta.

- c) **Número de hojas:** Se identificó la cantidad de hojas por cada vitroplanta al finalizar la etapa de multiplicación, es decir después de los 42 días de la siembra del explante.
- d) **Número de brotes adventicios:** A los 14 días de iniciada esta etapa se identificó con claridad la presencia de brotes adventicios de origen caulógeno, los que fueron cuantitativamente identificados.



Figura 9. Formación de brotes en el ecotipo Colorado de Mendoza bajo el efecto del MsM + Kin (1 mg/L) y AIA (2 mg/L).

Fuente: Propia, 2008.

4.3.3 Fase III. Etapa de microbulbificación.

Se seleccionaron las mejores vitroplantas, descartando aquellas que ostentaron escaso crecimiento, o malformaciones. Aquellas plántulas que mostraron un apropiado crecimiento fueron adecuadas para dar inicio al proceso de microbulbificación.

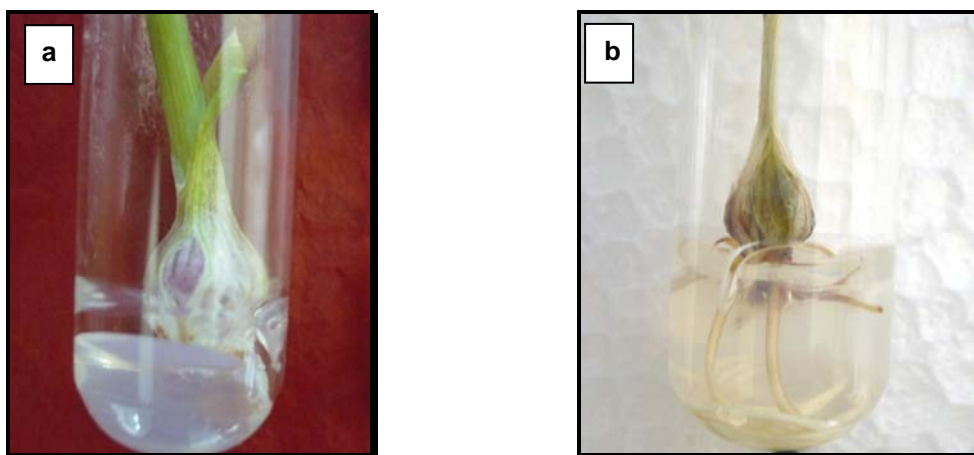


Figura 10. Formación de microbulbillos, ecotipo Rosado de Italia (a) y Colorado de Mendoza (b)

Fuente: Propia, 2008.

Al mismo tiempo se seleccionó el mejor medio nutritivo de la etapa de multiplicación (medio MsM), es decir aquel que demostró tener las condiciones más apropiadas para el desarrollo de brotes, manteniendo diferencias significativas satisfactorias con respecto a los otros medios de cultivo, para después ser denominado “medio mejorado” (Mm), en donde se modificó las diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 6%, 9% y 12%) que iniciaron el proceso de microbulbificación (Anexo.4) donde se introdujo a razón de un explante por tubo de ensayo en 2 ml medio nutritivo de microbulbificación.

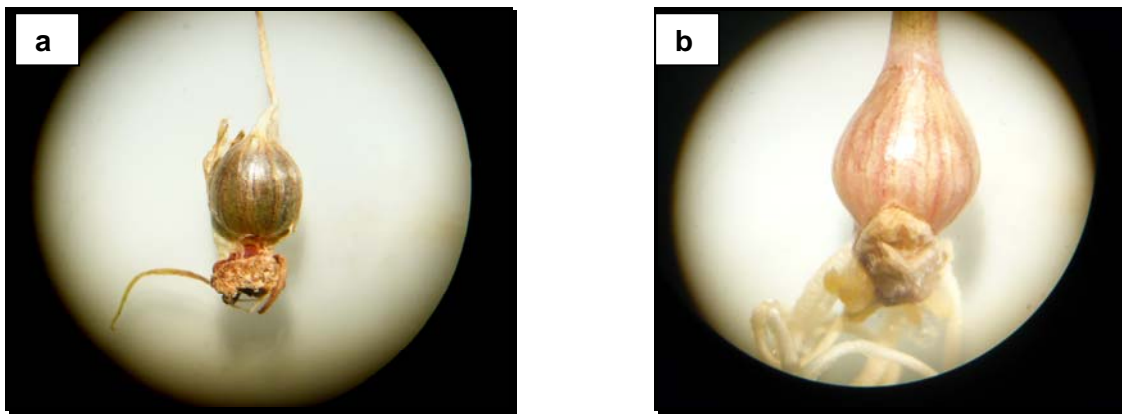


Figura 11. Desarrollo de microbulbillos en el ecotipo Colorado de Mendoza (a) al 6% de sacarosa y el ecotipo Rosado de Italia (b) al 9% de sacarosa.

Fuente: Propia, 2008.

4.3.3.1 Diseño experimental.

Para la etapa de microbulbificación se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con 10 repeticiones por tratamiento, donde los factores de estudio fueron los ecotipos (Colorado de Mendoza y Rosado de Italia), y la variación de concentraciones de sacarosa descritos de la siguiente manera:

Factor A: Ecotipos

a1 = Colorado de Mendoza.

a2 = Rosado de Italia.

Factor B: Concentraciones de sacarosa para la microbulbificación.

b1 = Mm + 3 % de sacarosa.

b2 = Mm + 6 % de sacarosa.

b3 = Mm + 9 % de sacarosa.

b4 = Mm + 12% de sacarosa.

(Mm.: Medio mejorado)

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos y repeticiones experimentales para la etapa de microbulbificación.

	Factor A: Ecotipos.	
	Colorado de Mendoza.	Rosado de Italia.
Factor B: Concentraciones de sacarosa.	$T_1 = a1\ b1$	$T_5 = a2\ b1$
	$T_2 = a1\ b2$	$T_6 = a2\ b2$
	$T_3 = a1\ b3$	$T_7 = a2\ b3$
	$T_4 = a1\ b4$	$T_8 = a2\ b4$

4.3.3.2 Variables de respuesta.

A continuación se describe las variables de respuesta evaluadas en la etapa de microbulbificación.

- a) Número de microbulbillos:** A la finalización de esta etapa (42 días) se contabilizó el número de microbulbillos por cada vitroplanta.

b) Diámetro de microbulbillos: Al término de los 42 días se midió el diámetro ecuatorial de cada microbulbillo *ex vitro* (medido en mm por un calibrador pálmer).

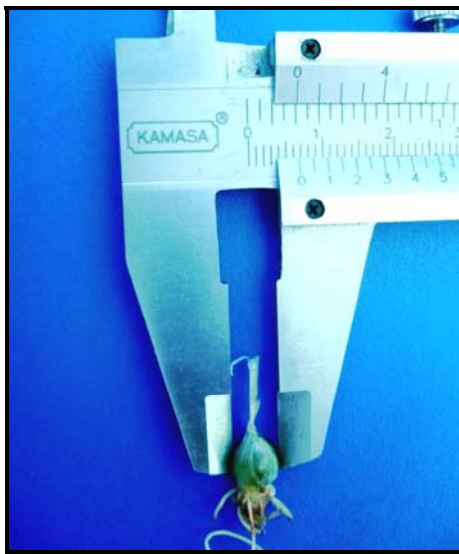


Figura 12. Cálculo del diámetro ecuatorial de microbulbillo (6.8 mm), extraído de condiciones *in vitro*.

Fuente: Propia, 2008.

c) Diámetro de microbulbillos curados: Los microbulbillos *ex vitro* fueron sometidos a temperatura ambiente por el lapso de 72 hrs lo que provocó la desecación de las hojas externas dando paso al proceso de curado, a continuación se midió el diámetro ecuatorial de cada microbulbillo curado (medido en mm por un calibrador pálmer).

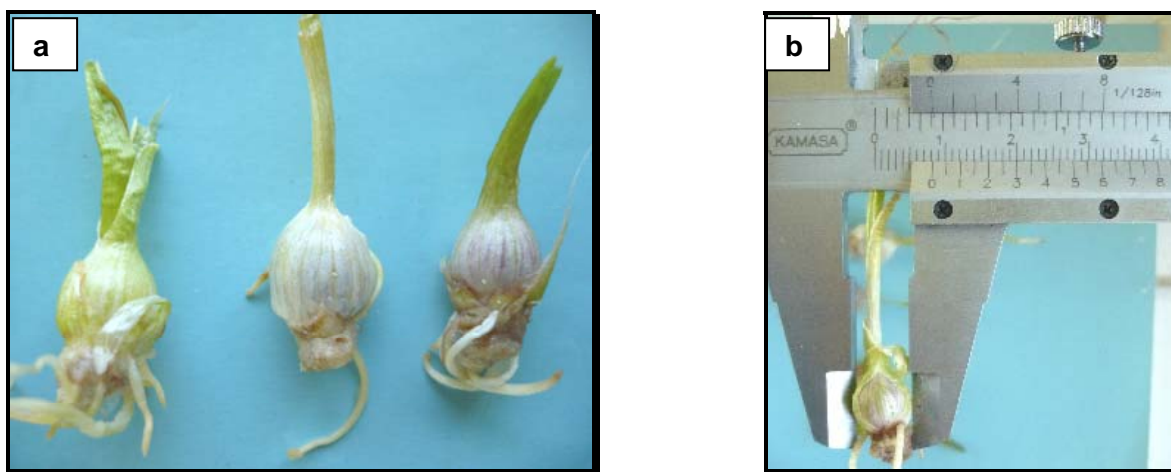


Figura 13. Microbulbillos en la etapa de curado (a) y medición del diámetro ecuatorial de microbulbillos curados (b), sometidos a 72 hrs de temperatura ambiente.

Fuente: Propia, 2008.

d) **Peso de microbulbillos *ex vitro*:** Posterior al curado se pesó cada microbulbillo por separado, mediante una balanza analítica.



Figura 14. Peso de microbulbillo *ex vitro*, en balanza analítica (0.28 g).

Fuente: Propia, 2008.

4.4 Modelo lineal aditivo.

Debido a que en las etapas de multiplicación y microbulbificación, el diseño utilizado fue el mismo; se utilizó un solo modelo estadístico con las siguientes características:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Cualquier observación.

μ = Media general.

α_i = Efecto del i – ésimo ecotipo de ajo.

β_j = Efecto del j – ésimo (Medio de cultivo y concentración de sacarosa.)

$(\alpha\lambda)_{ij}$ = Interacción ecotipos / (Medio de cultivo y concentración de sacarosa)

ϵ_{ijk} = Error experimental.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Para una mejor interpretación y comprensión de los resultados obtenidos en el presente estudio, se debe tener en cuenta que la investigación estuvo dividida en tres etapas, el establecimiento, la multiplicación, y la microbulbificación.

- a) En la etapa de establecimiento se procedió a determinar los indicadores principales del cultivo de tejidos *in vitro* (porcentaje de contaminación, porcentaje de supervivencia, altura final del explante y el número de hojas) con el fin de facilitar el desarrollo de posteriores análisis. El parámetro estadístico de evaluación estuvo respaldado por un análisis estadístico descriptivo de 40 vitroplantas por cada ecotipo en estudio, donde se analizó la media aritmética, la varianza, desvío estándar, error estándar y el coeficiente de variación por cada variable de respuesta establecida.
- b) En la etapa de multiplicación o micropropagación, la formación de brotes es un factor determinante, por lo tanto se procedió a seleccionar el mejor medio de cultivo que contribuyó en la formación de mayor número de brotes adventicios. El parámetro estadístico de evaluación fue un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con 10 repeticiones por tratamiento, donde los factores de estudio fueron los ecotipos (Colorado de Mendoza y Rosado de Italia), y los diferentes medios de cultivo.
- c) Para la etapa de microbulbificación se seleccionaron las plántulas de mayor desarrollo, las que fueron llevadas a los diferentes medios de bulbificación, compuestos por 4 diferentes concentraciones de sacarosa (3%,6%,9% y 12%). Esta etapa se evaluó bajo un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con 10 repeticiones por tratamiento, donde los factores de estudio fueron los ecotipos (Colorado de Mendoza y Rosado de Italia), y la variación de concentraciones de sacarosa.

5.1 Etapa de establecimiento.

En esta fase se observó un elevado porcentaje de supervivencia, atribuible a un especial cuidado en la extracción de meristemas, un adecuado manejo en la cámara de flujo laminar, y al efectivo protocolo de desinfección utilizado, manifestando resultados satisfactorios en esta etapa.

Las variables en estudio evaluadas son el, porcentaje de supervivencia, porcentaje de contaminación, número de hojas y altura final del explante, elementos que reflejan un adecuado establecimiento *in vitro*.

5.1.1 Porcentaje de supervivencia.

En esta etapa la rapidez y precisión en la extracción de meristemas fue fundamental, por lo tanto los resultados expuestos a continuación muestran un 92.7% de supervivencia para ambos ecotipos.

Cuadro 4. Análisis de supervivencia de meristemas.

Ecotipos	Nº de explantes totales	Nº de explantes supervivientes	Porcentaje de supervivencia (%)
Colorado de mendoza	48	46	95.8 %
Rosado de Italia	48	43	89.58 %
Promedio			92.69 %

Fuente: Elaboración propia.

Como se puede apreciar el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un 95.8 % de supervivencia, factor atribuible a la facilidad que presenta este ecotipo para la extracción de meristemas y al uso de un buen protocolo de desinfección, que eliminó el máximo de contaminación presente sobre el explante.

Por otro lado el ecotipo Rosado de Italia presentó 89.58 % de supervivencia, un poco menos a lo obtenido por el Colorado de Mendoza, si bien el protocolo de desinfección eliminó el máximo de contaminación presente sobre el explante, se detectó que el tejido meristemático de algunos explantes fue dañado, y aquellos de mayor tamaño y más tiempo en su extracción, al momento de haber sido sembrados no mostraron regeneración. Al respecto, Jiménez (1999) indica que un explante estéril en un medio de cultivo, pueden mostrar regeneración, siempre y cuando sus células meristemáticas no hayan sido afectadas al momento de utilizar el desinfectante químico.

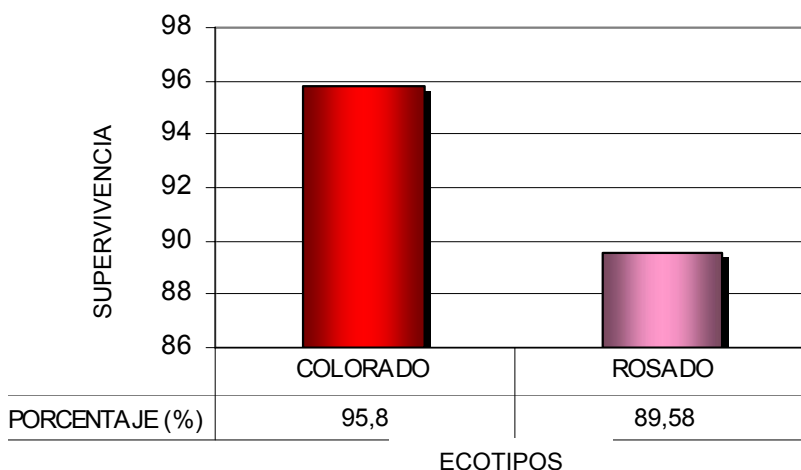


Figura 15. Comparación del porcentaje de supervivencia de los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.

5.1.2 Porcentaje de contaminación.

Como se observa en el cuadro 5, la contaminación registrada fue mínima, teniendo un total para ambos ecotipos de 14.5%.

Cuadro 5. Análisis del porcentaje de contaminación.

Ecotipos	Nº de explantes totales	Nº De explantes contaminados	Porcentaje de contaminación (%)
Colorado de mendoza	48	2	4.16 %
Rosado de Italia	48	5	10.41%
Total			14.57 %

Fuente: Elaboración propia.

El grado de contaminación que alcanzó el ecotipo Colorado de Mendoza fue de 4.1% nivel considerado como “baja contaminación”. En cuanto al ecotipo Rosado de Italia presentó un 10.41% de microorganismos contaminantes como ser *Penicillium* y *Aspergillus* (contaminantes comunes de laboratorio). La baja contaminación registrada concuerda con lo señalado por Jiménez (1999), que indica que mientras más pequeño es el explante, menor es el riesgo de contaminación.

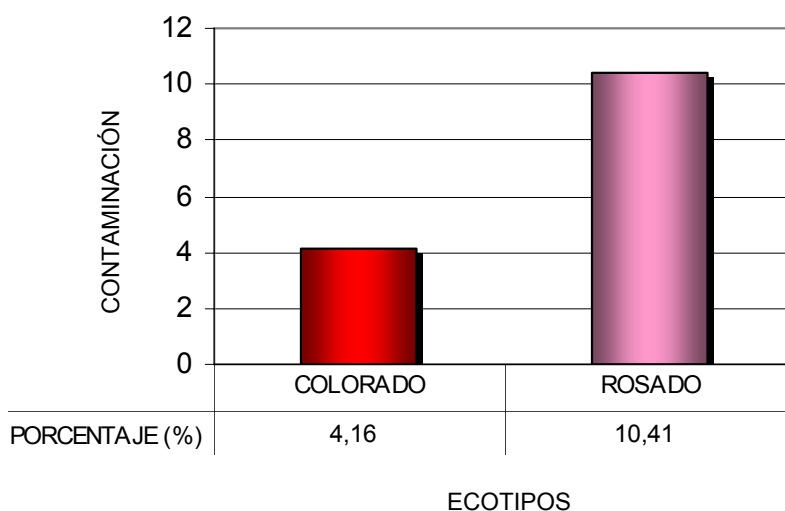


Figura 16. Comparación del porcentaje de contaminación de los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.

5.1.3 Número de hojas.

a) Media aritmética.

Una vez sembrados los explantes se apreció la formación de hojas a partir del día 14, los resultados obtenidos en el cuadro 6 indican un promedio de 3.6 hojas por cada vitroplanta para ambos ecotipos.

Cuadro 6. Número de hojas total y promedio por ecotipo.

Ecotipos	Nº de explante.	Nº de Hojas total	Promedio
Colorado de Mendoza	43	137	3.18
Rosado de Italia	43	175	4.0
			3.62

Fuente: Elaboración propia.

Para el ecotipo Colorado de Mendoza, se obtuvo un promedio de 3.18 hojas por cada vitroplanta. Al mismo tiempo el ecotipo Rosado de Italia, alcanzó un promedio mayor de 4.06 hojas. La diferencia en el número de hojas que presentan los ecotipos en estudio, están influenciados principalmente por las características fisiológicas propias de cada ecotipo (Darias, 1993).

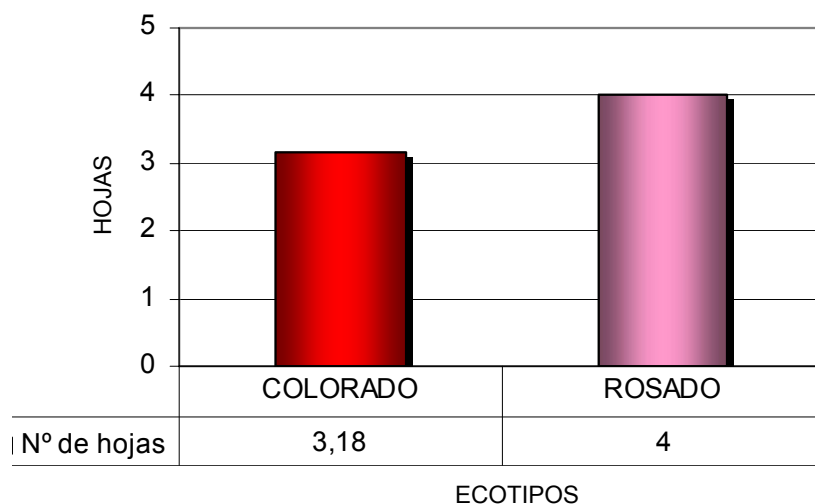


Figura 17. Comparación del número de hojas de los ecotipos: Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.

b) Varianza

Para ambos ecotipos se presentó un promedio de desviaciones al cuadrado con respecto a la media de 1.1 hojas, es decir que la variabilidad con respecto al número de hojas es de una sola.

Cuadro 7. Varianza con respecto al número de hojas por cada ecotipo.

ECOTIPOS	Nº de explantes Totales.	$\sum x$	$\sum x^2$	S^2
Colorado de Mendoza	43	137	489	1.2
Rosado de Italia	43	175	757	1.0
Total	86			

Fuente: Elaboración propia.

El cuadro 7 indica que el promedio de desviaciones al cuadrado con respecto a la media para el ecotipo Colorado de Mendoza será de 1.2 hojas, mientras que para el ecotipo Rosado de Italia el número de hojas que fluctuará con respecto a la media será de una; con lo que se corrobora lo mencionado por Darías (1993), que el número de hojas está influenciado por las características fisiológicas de cada ecotipo.

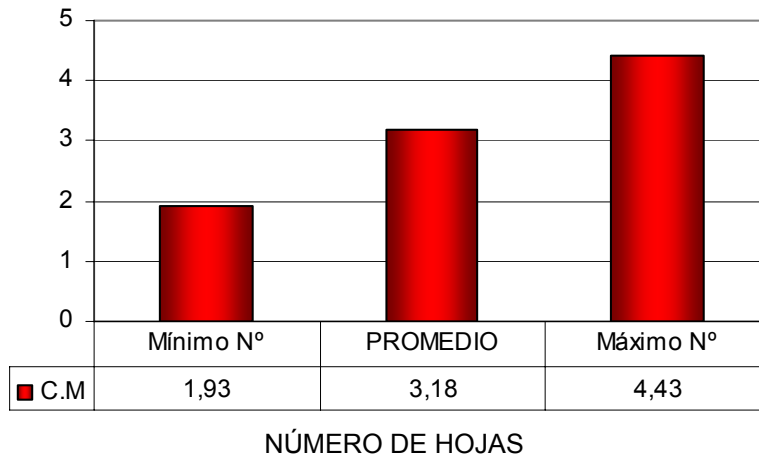


Figura 18. Comparación del máximo (4.43) y el mínimo (1.93) número de hojas con relación al promedio (3.18 hojas) para el ecotipo Colorado de Mendoza.

En la figura 18 se observa que, la variación en el número de hojas con respecto al promedio general es de 1.25 para el ecotipo Colorado, alcanzando como nivel máximo 4.4 y como mínimo 1.93 hojas en promedio, con relación al promedio general de 3.18 hojas.

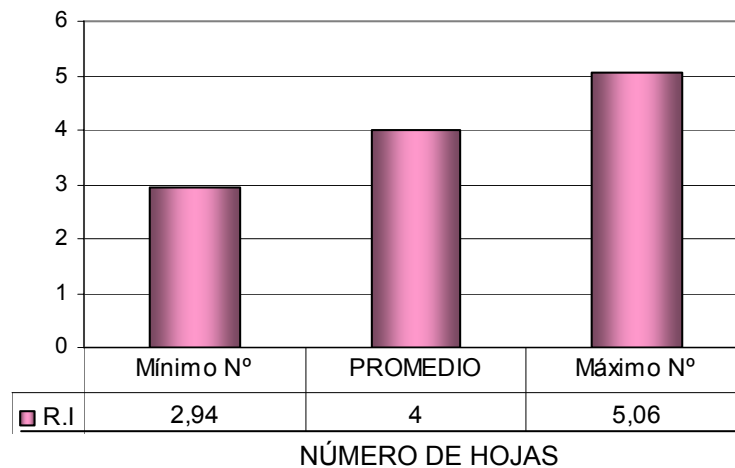


Figura 19. Comparación del máximo (5.06) y el mínimo (2.94) número de hojas con relación al promedio (4 hojas) para el ecotipo Rosado de Italia.

En la figura 19 se observa que la variación en el número de hojas con respecto al promedio general es 1.06 dando como resultado 5.06 hojas como nivel máximo, y como mínimo 2.94 hojas en promedio, con relación al promedio general 4 hojas.

c) Desvió estándar

Para el ecotipo Colorado de Mendoza se observa que la desviación en promedio es de más (+) menos (-) 1.09 con respecto a 3.18 hojas (la media), es decir que, el número de hojas por encima y por debajo de la media será de una sola. Mientras que para el ecotipo Rosado de Italia se observó que la desviación en promedio es de más (+) menos (-) una hoja por encima y por debajo de su media (4 hojas).

Cuadro 8. Desvío estándar con respecto al número de hojas por cada ecotipo.

ECOTIPOS	Nº de explantes Totales.	$\sum x$	$\sum x^2$	S
Colorado de Mendoza	43	137	489	1.09
Rosado de Italia	43	175	757	1.0
Total	86			

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 20 se observa la desviación estándar con respecto al promedio general para cada ecotipo, dando como resultado 4.27 hojas como nivel máximo, y 2.09 hojas como mínimo, con relación a la media de 3.18 hojas para el ecotipo Colorado de Mendoza. Para el ecotipo Rosado de Italia como nivel máximo 5.09 hojas, y como mínimo 2.91 hojas en promedio, con relación a la media de 4 hojas. Al respecto Smith (1992), indica que para promover el mayor número de hojas se debe considerar la relación auxina/citoquinina favoreciendo también el enraizamiento y la callogénesis.

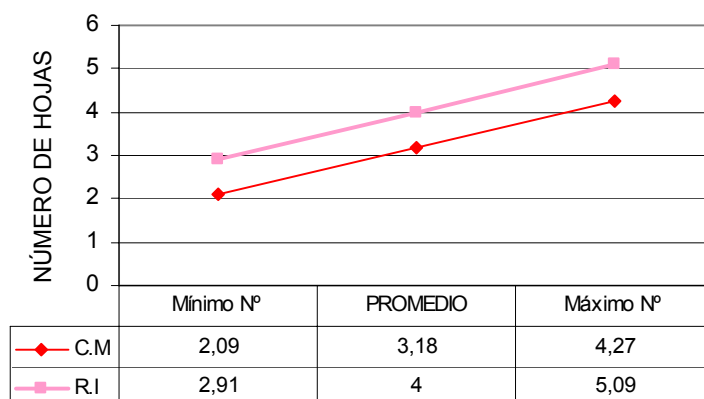


Figura 20. Comparación del máximo y el mínimo número de hojas con relación al promedio para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.

d) Coeficiente de variación:

El análisis realizado indica que el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un grado de dispersión entorno a la media de 34 %, este porcentaje indica un alto grado de dispersión de las observaciones realizadas, mientras que el ecotipo Rosado de Italia alcanzó un grado de dispersión del 25.5 % entorno a la media lo que indica un grado de dispersión aceptable para las observaciones realizadas.

Cuadro 9. Coeficiente de variación para el número de hojas en cada ecotipo.

ECOTIPOS	Nº de explantes Totales	Promedio	S	C.V
Colorado de Mendoza	43	3.18	1.11	34 %
Rosado de Italia	43	4.0	1.02	25.5 %
Total	86			

Fuente: Elaboración propia.

El coeficiente de variación del 34 %, obtenido por el ecotipo Colorado de Mendoza indica que la formación de hojas fue dispareja, variación atribuible al tamaño desigual de meristemas extraídos en el momento de la siembra (entre 2 y 5 mm). Asimismo el ecotipo Rosado de Italia alcanzó un 25.5 % de dispersión, lo que indica un desarrollo más uniforme entorno al número de hojas, puesto que, a la cuarta semana de establecimiento la mayoría de las vitroplantas pertenecientes a este ecotipo contaban con un promedio de 4 hojas debidamente constituidas.

La diferencia de los resultados presentados, está de acuerdo con lo mencionado por Jiménez (1999), quien señala que a medida que el explante varia de tamaño el crecimiento es desigual, cuando el explante es más pequeño menor es el riesgo de contaminación pero la regeneración es más difícil, mientras que con el aumento del tamaño del explante el peligro de contaminación es mayor pero la regeneración y el crecimiento son más rápidos

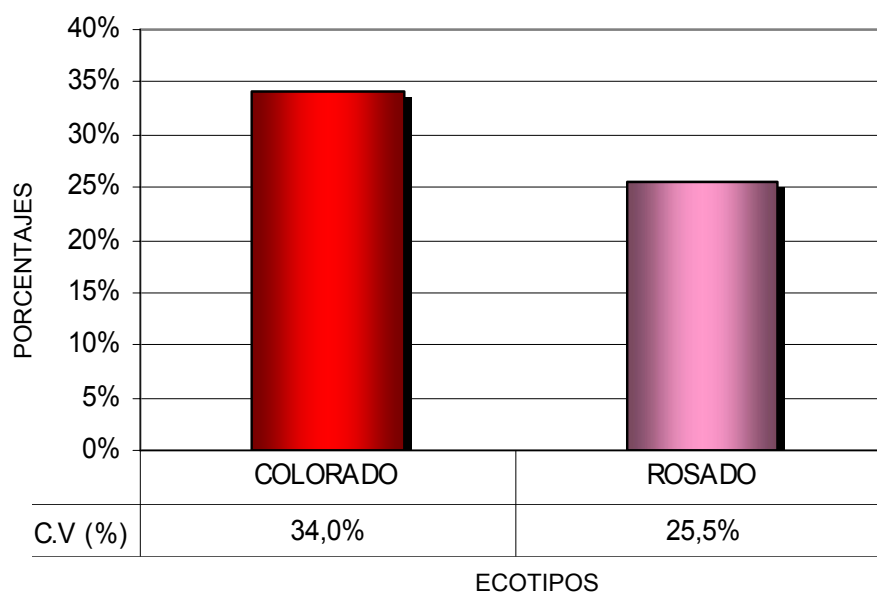


Figura 21: Comparación del Coeficiente de variación para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, con respecto al número de hojas.

e) Error estándar:

Al momento de realizar el seguimiento para esta etapa, se seleccionaron las vitroplantas más representativas (tamaño, forma, conformación) para ambos ecotipos, en el caso del Colorado de Mendoza se observó una desviación en promedio de 0.16 hojas con respecto a la media de las muestras evaluadas, en cuanto al ecotipo Rosado de Italia se apreció una desviación en promedio de 0.15 hojas con respecto a la media de las muestras evaluadas.

Cuadro 10. Error estándar para el número de hojas por cada ecotipo.

Ecotipos	Nº de explantes totales	Promedio	S	S x
Colorado de Mendoza	43	3.18	1.11	0.169
Rosado de Italia	43	4.0	1.02	0.15
Total	86			

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a esta mínima variación Vicente (2001), indica que mientras menor sea el rango de variación obtenido en las muestras evaluadas, mayor es la homogeneidad proporcionada al explante, al momento de la formación de hojas.

5.1.4 Altura final del explante

a) Media aritmética.

Se realizó un seguimiento semanal concerniente a la altura final del explante. En la cuarta semana de establecimiento se procedió a medir la altura final de cada vitroplanta, donde los resultados indican una altura promedio de 9.4 cm para ambos ecotipos, desarrollo óptimo para dar inicio a la siguiente etapa.

Cuadro 11. Altura final en promedio, para cada ecotipo.

Ecotipos	Nº de Explantes Totales	Total (cm)	Media
Colorado de Mendoza	43	432.8	9.02
Rosado de Italia	43	473.1	9.9
Promedio			9.4

Fuente: Elaboración propia.

El ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó una altura promedio de 9.02 cm mientras el ecotipo Rosado de Italia, logró un promedio mayor de 9.9 cm, variabilidad atribuible a las particulares propias de cada ecotipo.

Jiménez (1999), señala que la variación de la altura del explante puede deberse al tamaño del explante introducido en la etapa de establecimiento, lo que provoca una regeneración y crecimiento más rápido, y a las características fisiológicas propias de cada ecotipo.

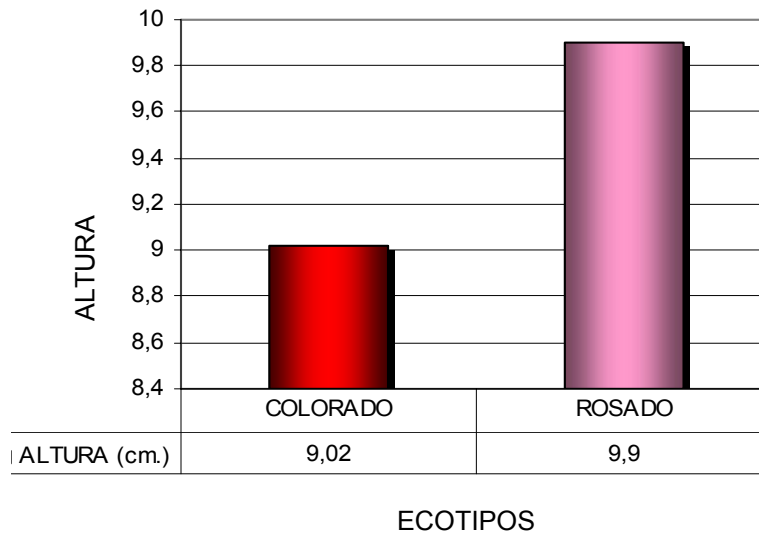


Figura 22. Comparación de la altura final que obtuvo el explante para los ecotipos: Colorado de Mendoza (9.02) y Rosado de Italia (9.9).

b) Varianza:

El ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó 2.82 cm como promedio de desviaciones con respecto a la media elevada al cuadrado, esta medida indica una variación del rango que establece la desviación estándar, por tanto la variación esperada con respecto a la altura de planta oscila entre 2.82 cm. y el rango de variación con respecto al desvío estándar para el ecotipo Rosado de Italia es de 2.63 cm como se aprecia en el cuadro 12.

Cuadro 12. Varianza de la altura final.

Ecotipos	Nº de explantes totales.	$\sum x$	$\sum x^2$	S^2
Colorado de Mendoza	43	432.8	4474,64	2.82
Rosado de Italia	43	473.1	5315,8	2.63
Total	86	905.9		

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto a estos resultados Vicente (2001), indica que el rango de variación obtenido en la altura final de planta es solo un promedio de desviaciones en las muestras evaluadas, estableciendo una mínima variación en la altura final para ambos ecotipos.

c) Desvío estándar

Para el ecotipo Colorado de Mendoza se observa que la desviación en promedio es de más (+) menos (-) 1.67 cm con respecto a 9.02 cm (la media), es decir que, el número de hojas por encima y por debajo de la media será de 1.67 cm. Un resultado similar, se muestra para el ecotipo Rosado de Italia donde se observó que la desviación en promedio es de más (+) menos (-) 1.62 cm por encima y por debajo de su media (9.9 cm) como se detalla a continuación en el cuadro 13:

Cuadro 13. Desvío estándar con respecto a la altura final del explante por cada ecotipo.

Ecotipos	Nº de explantes totales.	$\sum x$	$\sum x^2$	S
Colorado de Mendoza	43	432.8	4474,64	1.67
Rosado de Italia	43	473.1	5315,8	1.62
Total	86	905.9		

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 23 se observa la desviación estándar con respecto al promedio general para cada ecotipo, dando como resultado 10.69 cm como altura máxima, y 7.35 cm como altura mínima, con relación a la media de 9.02 cm para el ecotipo Colorado de Mendoza. Mientras que el ecotipo Rosado de Italia alcanzó una altura máxima de 11.52 cm, y 8.28 cm, como altura mínima con relación a la media de 9.9 cm, con lo que se corrobora lo mencionado por Darias (1993), que la altura final del explante está influenciado por las características fisiológicas de cada ecotipo.

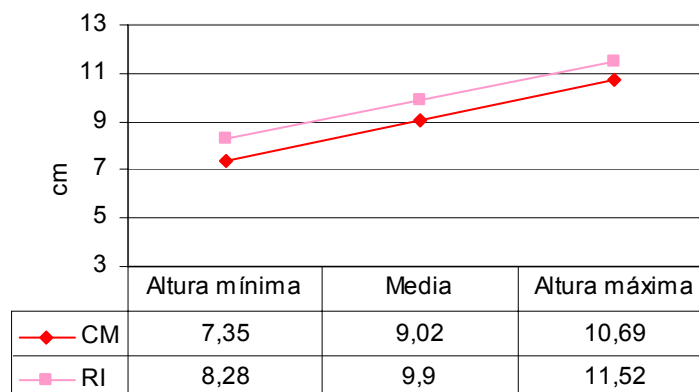


Figura 23. Comparación de la altura máxima y mínima con relación a la media, para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.

d) Coeficiente de variación:

El análisis realizado indica que el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un grado de dispersión entorno a la media de 18.51 %, este porcentaje indica un mínimo grado de dispersión de las observaciones realizadas, mientras que el ecotipo Rosado de Italia presentó un grado de dispersión del 16.36% entorno a la media lo que indica un menor grado de dispersión de las observaciones realizadas.

Cuadro 14. Coeficiente de variación para la altura final del explante.

Ecotipos	Nº de explantes totales.	Promedio	S	C.V
Colorado de Mendoza	43	9.02	1.67	18.51%
Rosado de Italia	43	9.9	1.62	16.36%
Total	86	9.46		

Fuente: Elaboración propia.

El coeficiente de variación de 18.5 %, obtenido por el ecotipo Colorado de Mendoza indica que el crecimiento del explante (en cm) fue homogéneo, esta menor variación reportada, es atribuible al tamaño uniforme de meristemos extraídos en el momento de la siembra. Asimismo el ecotipo Rosado de Italia obtuvo un 16.36 % de dispersión lo que indica un desarrollo uniforme entorno al crecimiento del explante, puesto que, a la cuarta semana de establecimiento la mayoría de las vitroplantas pertenecientes a este ecotipo contaban con un promedio de 9.9 cm de altura.

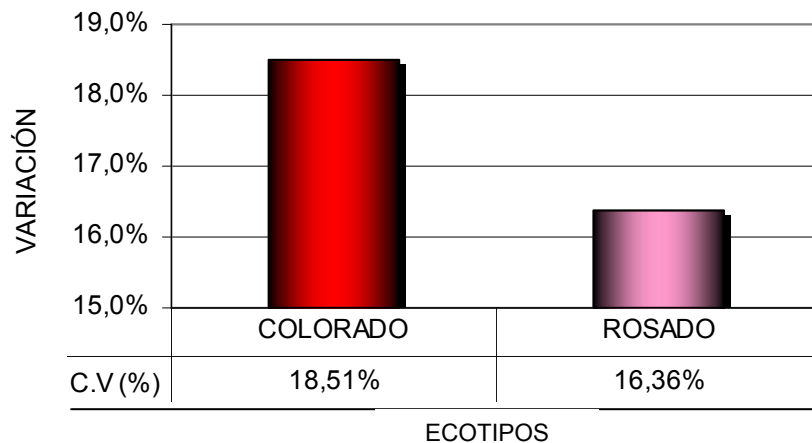


Figura 24. Comparación del coeficiente de variación para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, con respecto a la altura final del explante.

Vicente (2001), señala que bajos porcentajes de variación indican un mínimo grado de dispersión de las observaciones realizadas, refleja un homogéneo manejo para ambos ecotipos en estudio.

e) Error estándar:

Al momento de realizar el seguimiento para esta etapa, se seleccionaron las vitroplantas mas representativas (tamaño, forma, conformación) para ambos ecotipos, en el caso del Colorado de Mendoza se observó una desviación en promedio de 0.25 cm con respecto a la media de las muestras evaluadas, en cuanto al ecotipo Rosado de Italia se apreció una desviación en promedio de 0.24 cm con respecto a la media de las muestras. Para ambos ecotipos se observa una escasa diferencia entorno a las muestras evaluadas, esta baja dispersión reafirma lo mencionado por Vicente (2001), que indica, al existir una mínima diferencia entre los factores en estudio, la variación total en promedio será menor, indicando la confiabilidad y precisión de los resultados obtenidos.

Cuadro 15. Error estándar para la altura final del explante por cada ecotipo.

ECOTIPOS	Nº de explantes Totales.	Promedio	S	S x
Colorado de Mendoza	43	9.02	1.67	0.254
Rosado de Italia	43	9.9	1.62	0.247
TOTAL	86	9.46		

Fuente: Elaboración propia.

5.2 Etapa de multiplicación.

Esta fase tuvo por prioridad la obtención del mayor número de brotes adventicios, donde el “MsM” demostró ser el medio de cultivo que ofrece las mejores condiciones para la formación de brotes. Luego de la siembra de los explantes se procedió a evaluar las variables de respuesta planteadas, detallando los siguientes resultados a continuación.

5.2.1 Número de raíces

El número elevado de raíces aumenta el riesgo de contaminación al momento del repique, motivo por el cual inducir al enraizamiento es un proceso innecesario y contraproducente solo para esta etapa (Quezada1999).

Cuadro 16. Análisis de varianza para el número de raíces.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	6.25	6.25	20.58	7.12**
Medios (B)	3	15.18	5.06	16.67	4.14**
Interacción (A x B)	3	9.50	3.16	10.43	4.16**
Error	56	17.00	0.30		
TOTAL	63	47.93			

** = Altamente significativo al 1%
Fuente: Elaboración propia.

CV= 27.99 %

El análisis de varianza para el número de raíces (cuadro 16) indica un coeficiente de variación del 27.99% que se encuentra dentro del rango tolerable para esta investigación.

De esta manera podemos indicar que existen diferencias altamente significativas entre los ecotipos de ajo con relación al número de raíces.

En el cuadro 17, se observa la comparación de medias por prueba de Duncan, para el número de raíces, a un nivel de significancia del 1% donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio general de 1.6 raíces por cada vitroplanta. Asimismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio general de 2.3 raíces por cada vitroplanta.

Al respecto Darías (1993) indica que la diferencia en el número de raíces es atribuible a las características fisiológicas propia de cada ecotipo.

Cuadro 17. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el número de raíces.

ECOTIPOS	PROMEDIO	* DUNCAN
Colorado de Mendoza	1.6	A
Rosado de Italia	2.3	B

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

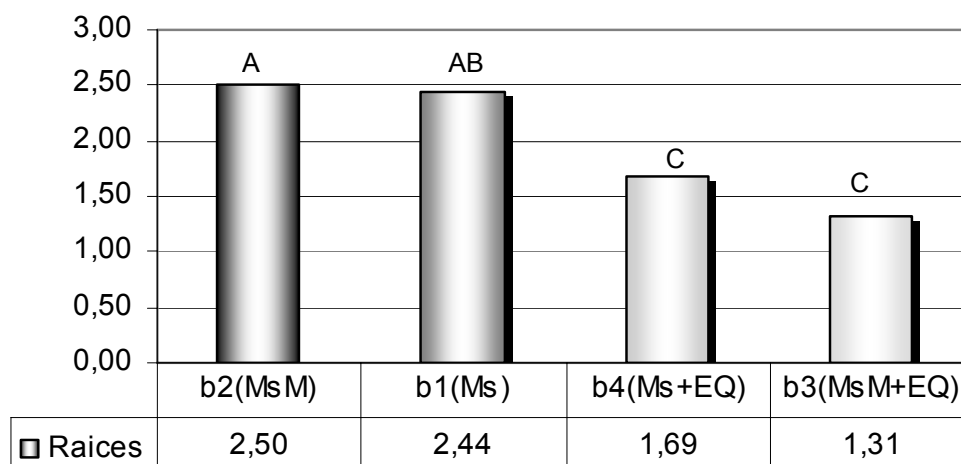
Para el factor (B) medios de multiplicación, podemos indicar que existen diferencias altamente significativas.

Cuadro 18. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan (1%) para el número de raíces.

MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO	* DUNCAN
MsM	2.5	A
Ms	2.4	A B
Ms+EQ	1.7	C
MsM+EQ	1.3	C

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

La prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% indica que no existe diferencias significativas entre los medios “MsM + EQ” y “Ms + EQ” alcanzando un promedio de 1.3 y 1.7 raíces respectivamente, demostrando de esta forma que no existe diferencias significativas entre sus promedios, aclarando que, mientras menor sea el número de raíces que se obtenga los riesgos de contaminación serán menores. No se encontraron diferencias significativas entre los medios “MsM” y “Ms” los cuales alcanzaron un promedio de 2.5 y 2.4 raíces respectivamente. Estos medios de multiplicación demuestran ser los más favorables para inducir al enraizamiento.



MEDIOS DE MULTIPLICACIÓN

Figura 25. Comparación de medias para la variable número de raíces por efecto de los diferentes medios de multiplicación b1= Ms = Sales de Murashige & Skoog con vitaminas sintéticas, b2= MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado (sustitución de KNO_3 , $MgSO_4$, NH_4NO_3), b3= MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado + extracto de quinua, y b4 = Ms + extracto de quinua.

La variable número de raíces (cuadro 16) demostró también la existencia de diferencias altamente significativas entre la interacción ecotipos de ajo (factor A) y medios de multiplicación (factor B) por lo tanto la interpretación de los resultados de esta fase se realizó mediante análisis de efectos simples para la principal interacción.

Cuadro 19. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable número de raíces.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
A (b1) Ms	1	0.0625	0.0625	0.205	7.126 NS
A (b2) MsM	1	12.25	12.25	40.37	7.126 (**)
A (b3) MsM + EQ	1	1.56	1.56	5.140	7.126 NS
A (b4) Ms + EQ	1	0.062	0.062	0.205	7.126 NS
B (a1) Colorado de Mendoza	3	9.125	3.041	10.01	4.16 (**)
B (a2) Rosado de Italia	3	15.34	5.113	4.809	4.16 (**)
ERROR	56	17.00	0.3035		
TOTAL	66				

(**) = Altamente significativo al nivel 1%
NS = No significativo estadísticamente.

El análisis de efectos simples (Cuadro 19), muestra diferencias altamente significativas entre el factor (A) ecotipos y el medio de multiplicación “MsM”, mientras que entre los medios “Ms”, “MsM +EQ” y “Ms + EQ” no existe diferencias significativas con respecto al comportamiento de los ecotipos. Para el factor (B) medios de multiplicación los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia manifiestan diferencias altamente significativas.

Por tanto se puede indicar que los factores no son independientes, es decir en cuanto el factor (B) medios de multiplicación cambia, el factor (A) ecotipos modifica su comportamiento.

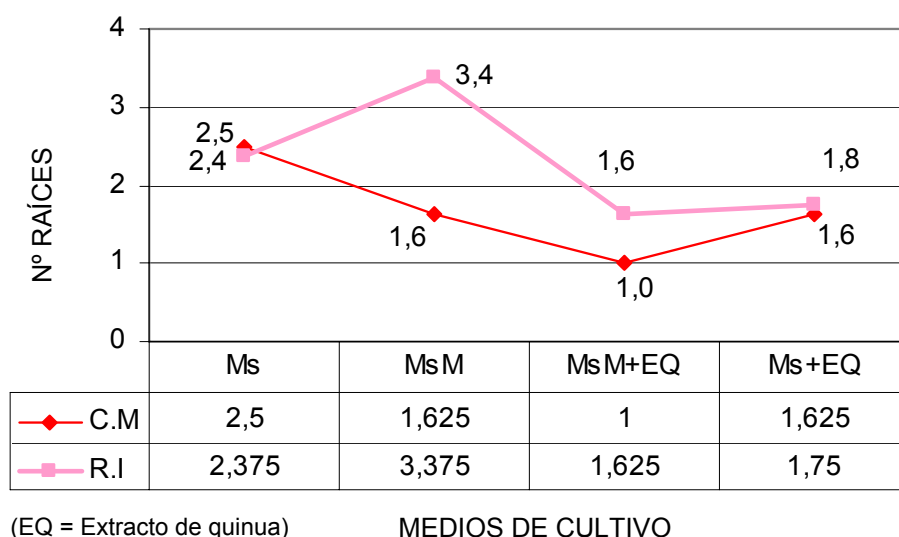


Figura 26. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios de multiplicación (factor B) para la variable número de raíces.

En la figura 26 se observa la interacción ecotipos (factor A) por (factor B) medios de multiplicación donde se aprecia que el ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó el mayor número de raíces (2.5 raíces) en presencia del el medio “Ms”, mientras que el medio “MsM +EQ” fue el que obtuvo el menor número de raíces (1 raíz) en promedio. El ecotipo Rosado de Italia fue el que alcanzó el mayor promedio en cuanto al número de raíces (3.3 raíces) en presencia del el medio “MsM”, mientras que el medio “MsM +EQ” fue el que obtuvo el menor número de raíces (1.6 raíces). Gómez (2008), menciona que la variación en el número de raíces esta fuertemente influenciada por el extracto de quinua (EQ), factor determinante en la etapa de enraizamiento.

En ambos ecotipos el factor que facilitó el manejo de esta etapa fue, el menor número de raíces ya que al momento del traslado a un nuevo medio de cultivo (subcultivo) los índices de contaminación registrada fueron mínimos (5 % para ambos ecotipos). Al respecto Pierik (1990), indica que la luz provoca un efecto inhibitor sobre la formación de raíces, ya que las plantas cultivadas en la oscuridad enraízan mejor. Esta afirmación es elemental puesto que el sistema radicular posee fototropismo negativo y al suministrar 16 hrs. luz indirectamente se está limitando el enraizamiento de las vitroplantas.

Uno de los efectos que llamó la atención fue, que a medida que se suministra el extracto de quinua en los medios de cultivo, el número de raíces disminuye considerablemente, para explicar este comportamiento se realizó el análisis entre los medios "Ms" y "Ms+EQ" siendo la principal diferencia entre ellos la presencia del extracto de quinua (EQ), asimismo se analizó los medios "MsM" y "MsM+EQ" siendo el factor diferencia la presencia del extracto de quinua. Para esta etapa los resultados se describen a continuación.

Cuadro 20. Análisis de regresión lineal para los medios "Ms" y "Ms+EQ".

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	3.4	-0.9	-1	1	$y = 3.4 + -0.9 x$
Rosado de Italia	3	-0.6	-1	1	$y = 3.3 + -0.6 x$

Fuente = Elaboración propia

El análisis de regresión lineal del cuadro 20 confirma que a medida que se suministra extracto de quinua, el número de raíces disminuye considerablemente. Para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, el coeficiente de determinación "r²" indica que la disminución de raíces es consecuencia del extracto de quinua en un 100%, así mismo el coeficiente de correlación "r" indica que existe una alto grado de asociación negativa entre los medios de cultivo y el número de raíces. Se puede esperar que a medida que se aumente la concentración del extracto de quinua, el número de raíces disminuirá considerablemente. El coeficiente de regresión "b" indica que por cada unidad de extracto

de quinua suministrado al medio “Ms” el número de raíces disminuirá en 0.9 raíces para el ecotipo Colorado y en 0.6 raíces para el ecotipo Rosado de Italia.

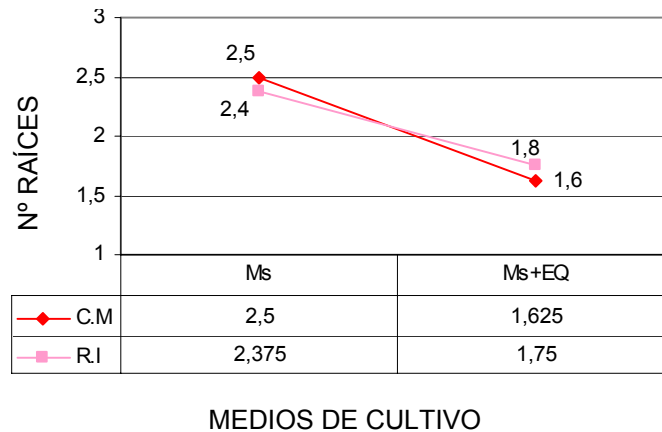


Figura 27. Variación del número de raíces por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”.

De la misma manera se realizó el análisis de regresión lineal en los medios “MsM” y “MsM+EQ” siendo el factor diferencia la presencia del extracto de quinua, reafirmando que, a medida que se suministra extracto de quinua el número de raíces disminuye considerablemente. Para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, el coeficiente de determinación “ r^2 ” indica que la disminución de raíces es consecuencia del extracto de quinua en un 100%, así mismo el coeficiente de correlación “ r ” indica que existe una alta correlación negativa entre los medios de cultivo y el número de raíces. Se puede esperar que a medida que se aumente la concentración del extracto de quinua, el número de raíces disminuirá considerablemente. El coeficiente de regresión “ b ” indica que por cada unidad de extracto de quinua suministrado al medio “MsM” el número de raíces disminuirá en 0.63 raíces para el ecotipo Colorado y en 1.75 raíces para el ecotipo Rosado de Italia como se detalla en el cuadro 21.

Cuadro 21. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y “MsM + EQ”.

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r^2	
Colorado de Mendoza	2.26	-0.63	-1	1	$y = 2.26 + -0.63x$
Rosado de Italia	5.13	-1.75	-1	1	$y = 5.13 + -1.75x$

Fuente = Elaboración propia.

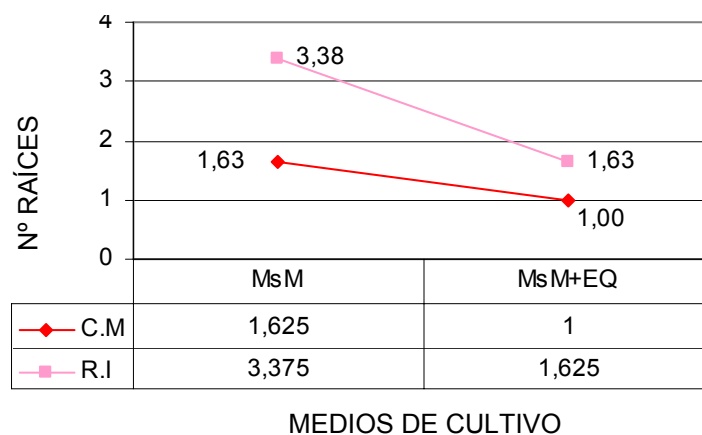


Figura 28. Variación del número de raíces por efecto del extracto de quinua en los medios “MsM” y “MsM + EQ”.

Al respecto Quezada (1999), indica que esta variable de respuesta debe ser evaluada debido a que la presencia de raíces en los explantes, dificulta la manipulación de los mismos en el proceso de traspaso a medio fresco (subcultivo). Por lo tanto, aumenta la posibilidad de una contaminación superficial o del mismo explante colocado al medio fresco. Este es un factor negativo en la etapa de multiplicación, que es bueno evaluar para determinar los medios y los ecotipos que desarrollan menor cantidad de raíces.

5.2.2 Altura final de planta.

A los 42 días después de iniciada la etapa de multiplicación se registró la altura final de planta (en cm). Ambos ecotipos presentaron un crecimiento favorable, lo que permitió evaluar la eficiencia que proporciona el medio de cultivo, y la respuesta de la vitroplanta para alcanzar una altura óptima, que le permita desarrollar el mayor número de brotes adventicios de carácter caulógeno.

Cuadro 22. Análisis de varianza para altura final de planta.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	265.283	265.283	32.025	7.12 (**)
Medios (B)	3	31.563	10.521	1.270	4.16 NS
Interacción (AxB)	3	49.534	16.511	1.993	4.16 NS
Error	56	463.878	8.283		
TOTAL	63	810.259			

(**) = Altamente significativo al 1%
NS = No significativo estadísticamente.

CV= 22.57 %

De acuerdo al cuadro 22, el coeficiente de variación fue de 22.57% que se encuentra dentro del rango tolerable para esta investigación. También se observó que los resultados obtenidos prueban la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia (factor A) a un nivel de significancia del 1%.

En el cuadro 23, se observa la comparación de medias por prueba de Duncan para la altura final de planta a un nivel de significancia del 1% donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio de 10.44cm. Así mismo el ecotipo Rosado de Italia, fue el que obtuvo un promedio mayor de 14.79 cm por cada vitroplanta. Con lo que se corrobora lo mencionado por Darías (1993), que la altura esta influenciada por las características fisiológicas propias de cada ecotipo.

Cuadro 23. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan para altura final de planta.

ECOTIPOS	PROMEDIO (cm)	* DUNCAN
Colorado de Mendoza	10.44	A
Rosado de Italia	14.79	B

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

El análisis de fuentes de variación también reporto que no se halló significación estadística para los diferentes medios de multiplicación (factor B), la prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% confirma este resultado, indicando que no existe diferencias significativas entre los medios “Ms”, “MsM”, “MsM + EQ” y “Ms + EQ” es decir que los medios de cultivo proporcionan condiciones uniformes para la altura de las vitroplantas.

Cuadro 24. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para altura final de planta.

MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO (cm)	* DUNCAN
MsM. +EQ	13.64	A
Ms. + EQ	13.21	A B
MsM.	12.26	A B C
Ms.	11.35	A B C

* / Letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencias

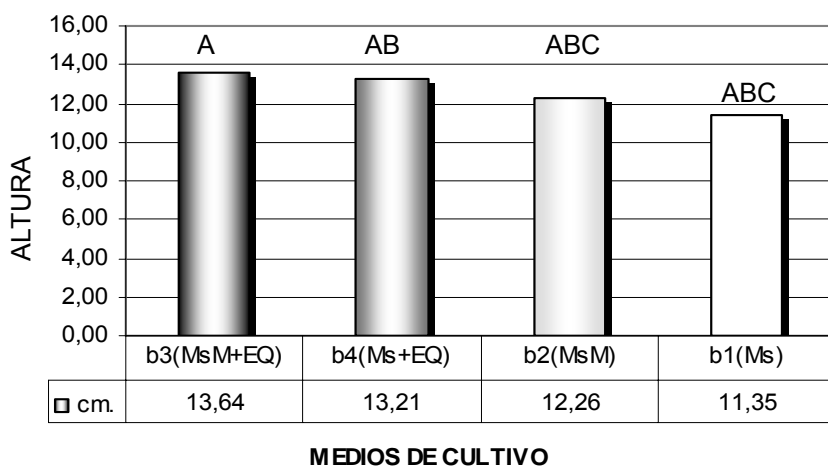


Figura 29 Comparación de medias para la variable altura de planta (cm.) por efecto de los diferentes medios de multiplicación b1= Ms = Sales de Murashige & Skoog con vitaminas sintéticas, b2= MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado (sustitución de KNO_3 , $MgSO_4$, NH_4NO_3), b3= MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado + extracto de quinua, y b4 = Ms + extracto de quinua.

Para el factor (A x B) interacción ecotipos de ajo por medios de multiplicación el análisis de fuentes de variación reportó que no existe diferencias significativas entre los factores en estudio. Por tanto se puede concluir que los factores son independientes uno del otro, es decir cuando el factor medios de cultivo cambia los ecotipos en estudio demuestran un comportamiento independiente al momento de expresar su altura en cm. Esta conducta independiente puede estar influenciada por el fototropismo positivo, la temperatura.

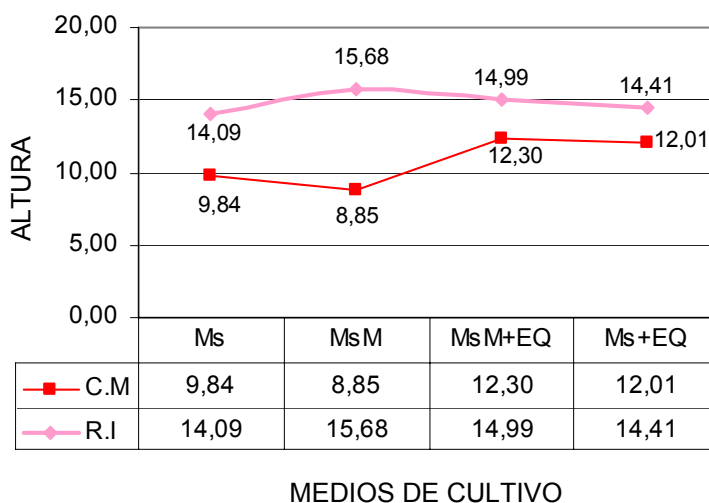


Figura 30. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios de multiplicación (factor B) para la variable altura final de planta en cm.

En la figura 30 se observa la interacción ecotipos (factor A) por (factor B) medios de multiplicación donde se aprecia que el ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó la mayor altura (12.3 cm) en presencia del el medio “MsM + EQ”, mientras que el medio “MsM” fue el que obtuvo la menor altura (8.8 cm) en promedio. El ecotipo Rosado de Italia fue el que alcanzó el mayor promedio de altura (15.68 cm) en presencia del el medio “MsM”, mientras que el medio “Ms” fue el que obtuvo la menor altura (14.09 cm).

Para esta variable también se analizó el efecto que causa el extracto de quinua sobre la altura en las vitroplantas donde, a medida que se suministra el extracto de quinua en los medios de cultivo, la altura de vitroplanta varía. Para explicar este comportamiento se realizó el análisis entre los medios “Ms” y “Ms+EQ” siendo la principal diferencia entre ellos la presencia del extracto de quinua, asimismo se analizó los medios “MsM” y “MsM+EQ” siendo el factor diferencia la presencia del extracto de quinua. Para esta etapa los resultados se describen a continuación.

Cuadro 25. Análisis de regresión lineal para los medios “Ms” y “ Ms + EQ ” para la variable altura de planta (cm.)

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	7.67	2.17	1	1	$y = 7.67 + 2.17 x$
Rosado de Italia	13.77	0.32	1	1	$y = 13.7 + 0.32 x$

Fuente = Elaboración propia

El análisis de regresión lineal del cuadro 25 indica que a medida que se suministra extracto de quinua en los medios de cultivo la altura de vitroplantas aumenta. Para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, el coeficiente de determinación “r²” indica que el aumento en la altura de vitroplanta es consecuencia del extracto de quinua en un 100%, así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe una alta correlación positiva entre los medios de cultivo y la altura de vitroplanta. Se puede esperar que a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua, la altura de vitroplanta aumentará considerablemente. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada unidad

de extracto de quinua suministrado al medio “Ms” la altura de vitroplanta aumentará en 2.1 cm en el ecotipo Colorado y en 0.32 cm para el ecotipo Rosado de Italia. Al respecto Gómez (2008), indica que, el extracto de quinua es utilizado en el cultivo de tejidos por su contenido alto en tiamina (0.84 mg), esta vitamina aporta metabolitos esenciales para el desarrollo fisiológico y metabólico de las vitroplantas.

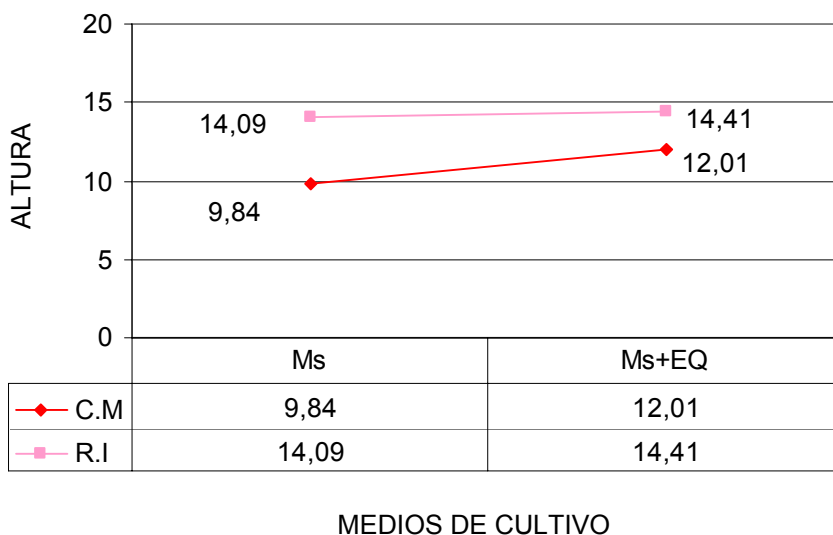


Figura 31. Variación de la altura de planta (en cm.) por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”.

Del mismo modo se analizó el efecto del extracto de quinua suministrado al medio “MsM” (Murashige & Skoog Modificado) demostrando los siguientes resultados:

Cuadro 26. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y “ MsM + EQ” .

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	5.4	3.45	1	1	y = 5.4+ 3.45x
Rosado de Italia	16.37	-0.69	-1	1	y = 16.37+ -0.69x

Fuente = Elaboración propia.

Para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, el coeficiente de determinación r^2 indica que la variación con respecto a la altura de vitroplanta es producto del extracto de quinua en un 100%, así mismo el coeficiente de correlación r indica que existe una alta correlación positiva entre los medios de cultivo y la altura de vitroplanta. Se puede esperar que a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua, la altura de vitroplanta aumentará considerablemente para el ecotipo Colorado de Mendoza, El coeficiente de regresión b indica que por cada unidad de extracto de quinua suministrado al medio "MsM" la altura de vitroplanta aumentará en 3.4 cm En tanto para el ecotipo Rosado de Italia se manifiesta un coeficiente de correlación r de -1 indicando que existe un alto grado de asociación negativa entre los medios y la altura de vitroplanta. Se puede esperar que a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua, la altura de vitroplanta disminuirá considerablemente. El coeficiente de regresión b indica que por cada unidad de extracto de quinua suministrado al medio "MsM" la altura de vitroplanta disminuirá en 0.69 cm para el ecotipo Rosado de Italia.

De acuerdo con Mendoza (2008), el extracto de quinua causa un efecto desfavorable en el medio "MsM" limitando el crecimiento del ecotipo Rosado de Italia dicho efecto es tolerado por el ecotipo Colorado de Mendoza factor atribuible a las características genóticas propias de cada ecotipo.

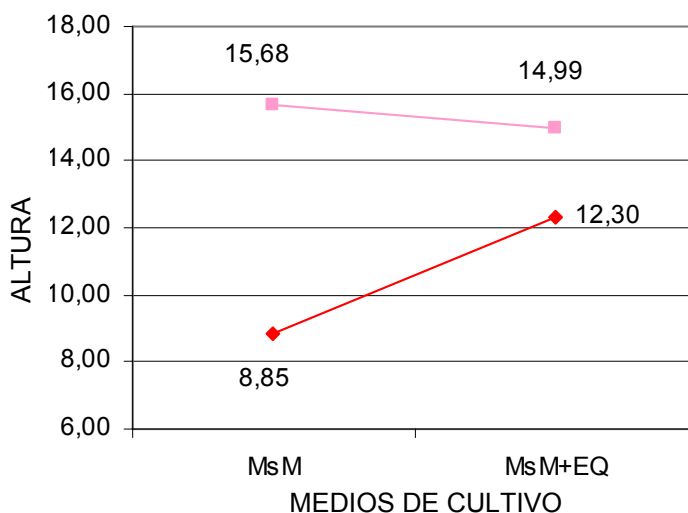


Figura 32. Variación de la altura de planta (en cm) por efecto del extracto de quinua en los medios " MsM " y " MsM + EQ ".

5.2.3 Número de hojas

A los 42 días después de iniciada la etapa se registró el desarrollo de hojas, indicador del adecuado desarrollo del explante en condiciones *in vitro*. A continuación se detalla las fuentes de variación para esta variable.

Cuadro 27. Análisis de varianza para número de hojas.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	3.515	3.515	10.714	7.12 (**)
Medios (B)	3	2.9218	0.9739	2.9683	4.16 NS
Interacción (AxB)	3	3.4218	1.1406	3.4762	4.16 NS
Error	56	18.375	0.3281		
TOTAL	63	28.2343			

(**) = Altamente significativo al 1%
NS = No significativo estadísticamente.

CV= 19.82 %

De acuerdo al cuadro 27, el coeficiente de variación 19.82% demuestra la confiabilidad de los resultados para esta investigación. También se observó que los resultados obtenidos comprueban la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia (factor A) a un nivel de significancia del 1%.

La prueba rango múltiple de Duncan confirma la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia. En el cuadro 28, se observa la comparación de medias para el número de hojas a un nivel de significancia del 1%, donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio de 3.1 hojas. Asimismo mismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio menor de 2.6 hojas por cada vitroplanta. De acuerdo con Gómez (2008), la formación de hojas es un proceso fisiológico que favorece el desarrollo de otros órganos como ser raíces y brotes.

Cuadro 28. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan 1% para el número de hojas.

ECOTIPOS	PROMEDIO	* DUNCAN
Colorado de Mendoza	3.1	A
Rosado de Italia	2.6	B

*/ Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

El análisis de fuentes de variación reportó que no se halló significación estadística para los diferentes medios de multiplicación (factor B), la prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% confirma este resultado indicando que no existe diferencias significativas entre los medios “Ms”, “MsM”, “MsM + EQ” y “Ms + EQ” es decir que los medios de cultivo proveen condiciones uniformes para la formación de hojas.

Vicente (2008), indica que, el hecho de no hallar diferencias significativas, refleja que los elementos en estudio, están influenciados por otro tipo de factores, que restringen su expresión, como ser temperatura, luz, fotoperiodo, humedad.

Cuadro 29. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan (1%) para el número de hojas.

MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO	* DUNCAN
MsM.	3.25	A
Ms.	2.81	A B
Ms +EQ.	2.81	A B C
MsM + EQ.	2.69	A B C

*/ Letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencias

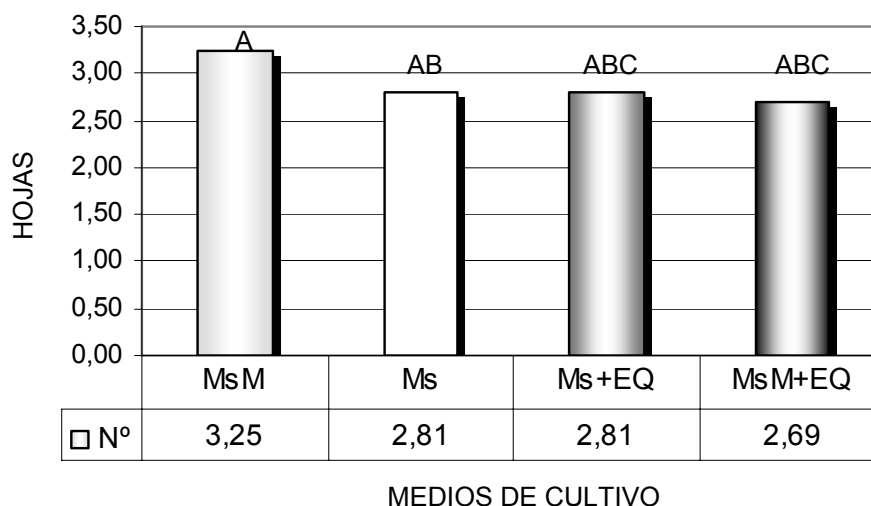


Figura 33. Comparación de medias para la variable número de hojas por efecto de los diferentes medios de multiplicación b1= Ms = Sales de Murashige & Skoog con vitaminas sintéticas, b2= MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado (sustitución de KNO₃, MgSO₄, NH₄NO₃), b3= MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado + extracto de quinua, y b4 = Ms + extracto de quinua.

Para el factor interacción (A x B) ecotipos de ajo por medios de multiplicación, el análisis de fuentes de variación reportó que no existe diferencias significativas entre los factores en estudio. Por tanto se puede concluir que los factores son independientes uno del otro, es decir, los diferentes medios de cultivo no ejercen ninguna influencia en los ecotipos de ajo, al momento de la formación de hojas. Darías (1993), indica que esta conducta independiente puede estar influenciada por el fototropismo positivo de las hojas, además del número de brotes obtenido.

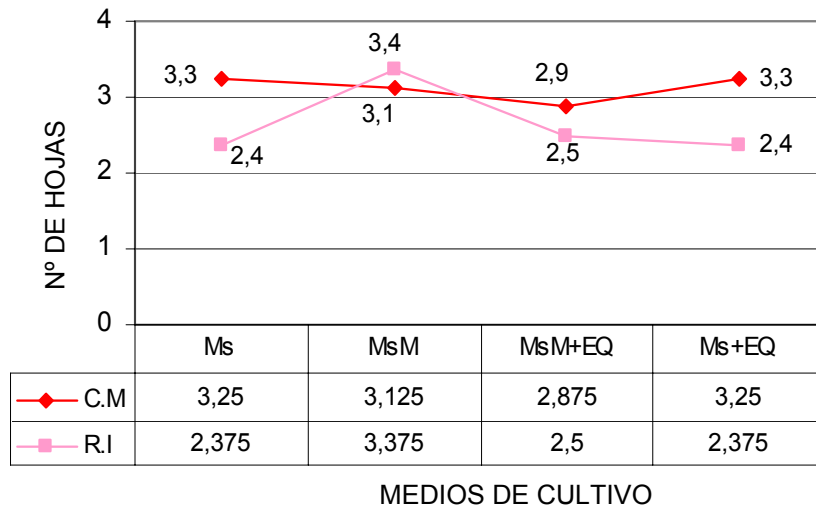


Figura 34. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios de multiplicación (factor B) para la variable número de hojas.

La figura 34 relaciona la interacción ecotipos de ajo (factor A) por (factor B) medios de multiplicación donde el ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó el mayor número de hojas (3.25) en presencia de los medios: “Ms” y “Ms + EQ”, mientras que el medio “MsM+ EQ” fue el que obtuvo el menor número de hojas en promedio (2.8). El ecotipo Rosado de Italia alcanzó el mayor número de hojas (3.3) en presencia del el medio “MsM”, mientras que los medios “Ms” y “Ms + EQ” obtuvieron un menor número de hojas (2.3).

El análisis realizado anteriormente estimuló interrogantes como ser, que efecto causa el extracto de quinua en el medio “Ms”, donde, a medida que se suministra el extracto de quinua en los medios de cultivo, el número de hojas no varía. Para explicar este comportamiento se realizó el análisis entre los medios “Ms” y ”Ms+EQ” siendo la principal diferencia entre ellos la presencia del extracto de quinua, asimismo se analizó los medios

“MsM” y “MsM+EQ” siendo el factor diferencia la presencia del extracto de quinua donde los resultados se describen a continuación.

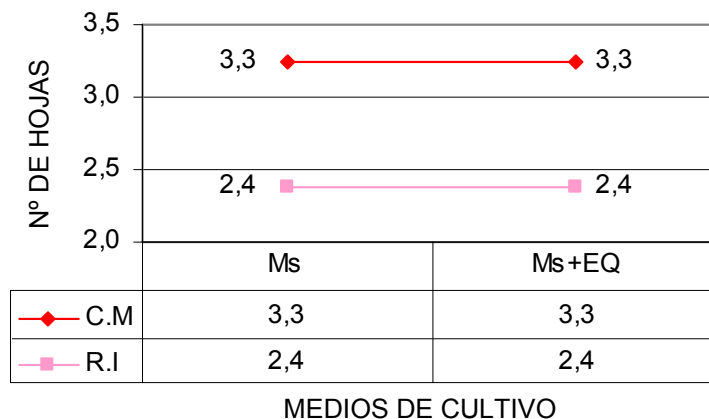


Figura 35. Variación en el número de hojas por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”.

El análisis de regresión lineal indica que a medida que se suministra extracto de quinua en el medio basal “Ms” el número de hojas no varía, puesto que un coeficiente de determinación “ r^2 ” de “0” (cero) indica que la formación de hojas no es consecuencia del extracto de quinua, al contrario es un factor independiente. Así mismo el coeficiente de correlación “ r ” de “0” (cero) indica que los factores no están relacionados entre si. Se puede esperar que a medida que aumente la proporción de extracto de quinua, el número de hojas se manifestará independientemente. En síntesis podemos afirmar que el extracto de quinua no afecta en el desarrollo de hojas en el medio “Ms” para ambos ecotipos.

Del mismo modo se analizó el efecto del extracto de quinua suministrado al medio “MsM” (Murashine y Skoog modificado) demostrando los siguientes resultados:

Cuadro 30. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y “MsM + EQ” .

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r^2	
Colorado de Mendoza	3.3	-0.2	-1	1	$y = 3.3 + -0.2x$
Rosado de Italia	4.3	-0.9	-1	1	$y = 4.3 + -0.9x$

Fuente = Elaboración propia.

Para los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia, el coeficiente de determinación r^2 indica que la variación con respecto al número de hojas es producto del extracto de quinua en un 100%, así mismo el coeficiente de correlación r indica que existe una alta correlación negativa entre los medios de cultivo y el número de hojas. Se puede esperar que a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua en el medio basal "MsM", el número de hojas disminuirá proporcionalmente para ambos ecotipos. El coeficiente de regresión "b" indica que por cada unidad de extracto de quinua suministrado al medio "MsM" el número de hojas disminuirá en 0.2 para el ecotipo Colorado, y en 0.9 hojas para el ecotipo Rosado de Italia

Mendoza (2008), indica que, el extracto de quinua causa un efecto desfavorable en el medio "MsM" limitando la formación de hojas para ambos ecotipos, este efecto puede ser causado por el antagonismo existente entre la formulación del "MsM" (sales comerciales) y el extracto de quinua (ingredientes no purificados).

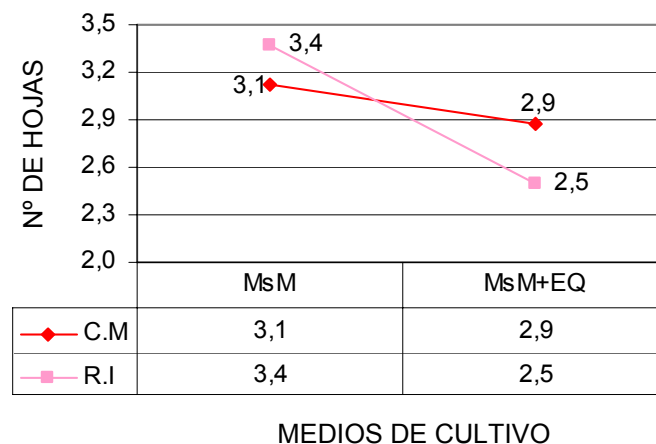


Figura 36. Variación en el número de hojas por efecto del extracto de quinua en los medios "MsM" y "MsM + EQ".

5.2.4 Número de brotes adventicios.

Luego de haber finalizado la siembra de explantes se procedió a la evaluación de esta variable. Se identificó con claridad la presencia de brotes adventicios de origen caulógeno a partir del día 25, los mismos que fueron evaluados al término de esta etapa, es decir después de los 42 días pasada la siembra del explante, con los siguientes resultados

Cuadro 31. Análisis de varianza para el número de brotes.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	0.390	0.390	7.60	7.12 (**)
Medios (B)	3	0.671	0.223	4.36	4.16 (**)
Interacción (AxB)	3	0.671	0.223	4.36	4.16 (**)
Error	56	2.87	0.051		
TOTAL	63	4.60			

(**) = Altamente significativo al 1%
 NS = No significativo estadísticamente.

CV= 21.02%

El coeficiente de variación del cuadro 31 indica un 21.02% de variación, demostrando la confiabilidad de los resultados obtenidos para esta investigación. También se observó que los resultados obtenidos comprueban la existencia de diferencias estadísticas altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia (factor A) a un nivel de significancia del 1%.

La prueba rango múltiple de Duncan confirma la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia. En el cuadro 32, se observa la comparación de medias para el número de brotes a un nivel de significancia del 1%, donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio de 1.16 brotes. Del mismo modo mismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio menor de 1 brote por cada vitroplanta.

Cuadro 32. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el número de brotes.

ECOTIPOS	PROMEDIO	* DUNCAN
Colorado de Mendoza	1.16	A
Rosado de Italia	1	B

*/ Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

El análisis de fuentes de variación reportó diferencias altamente significativas entre los medios de multiplicación (factor B), demostrando de esta manera, la heterogeneidad de los medios para la formación de brotes. La prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% de forma más específica, demostró que los medios “MsM” y “ MsM + EQ”

significativamente son diferentes, en comparación a los restantes medios de multiplicación, siendo el “MsM” el medio de multiplicación más eficaz, al proveer las condiciones más favorables para la formación de brotes, puesto que superó a los demás medios de cultivo, alcanzando un promedio de 1.16 brotes. No se encontraron diferencias significativas entre los medios “Ms” y “Ms + EQ” que demostraron la formación de 1 brote en promedio respectivamente.

Cuadro 33. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan (1%) para el número de brotes.

MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO	* DUNCAN
MsM.	1.25	A
MsM + EQ.	1.06	A B
Ms.	1.00	B C
Ms + EQ.	1.00	B C

* / Letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencias.

Los resultados que se observa en el cuadro 33, entre los medios de cultivo y el número de brotes, esta relacionado con la capacidad de regeneración de brotes que viene determinada por el genotipo, las condiciones ambientales (suministro de nutrientes, reguladores, condiciones físicas) y el estado de desarrollo de la vitroplanta (Pierik, 1990).

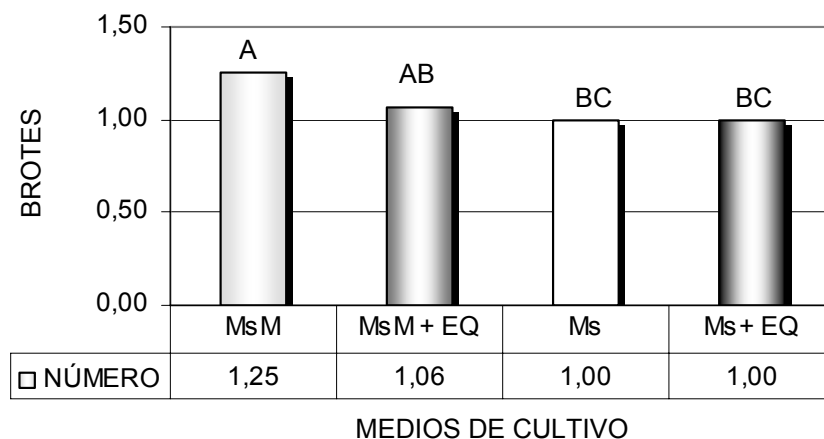


Figura 37. Comparación de medias para la variable número de brotes por efecto de los diferentes medios de multiplicación Ms = Sales de Murashige & Skoog con vitaminas sintéticas, MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado (sustitución de KNO₃, MgSO₄, NH₄NO₃), MsM = Sales de Murashige & Skoog Modificado + extracto de quinua, y Ms + extracto de quinua.

La variable número de brotes adventicios (cuadro 31) demostró también la existencia de diferencias altamente significativas entre (A x B) la interacción, ecotipos de ajo (factor A) y medios de multiplicación (factor B) por tanto, la interpretación de los resultados de esta fase se realizó mediante un análisis de efectos simples para la principal interacción.

Cuadro 34. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable número de brotes adventicios.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
A (b1) Ms	1	0	0	0	7.12 NS
A (b2) MsM	1	1	1	20	7.12 (**)
A (b3) MsM + EQ	1	0.06	0.06	1.2	7.12 NS
A (b4) Ms + EQ	1	0	0	0	7.12 NS
B (a1) Colorado de Mendoza	3	1.34	0.45	9	4.16 (**)
B (a2) Rosado de Italia	3	0	0	0	4.16 NS
ERROR	56	2.87	0.05		
TOTAL	66				

(**) = Altamente significativo al nivel 1%

NS = No significativo estadísticamente.

El análisis de efectos simples (Cuadro 34.), muestra que se encontraron diferencias altamente significativas entre los ecotipos de ajo (factor A) y el medio de multiplicación “MsM”, y no así para los medios “Ms”, “MsM +EQ” y “Ms + EQ” puesto que entre ellos no existe diferencias significativas con respecto a los ecotipos (factor “A”). Para el factor (B) medios de multiplicaciones se encontraron diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo y el ecotipo Colorado de Mendoza, mientras que el Rosado de Italia no manifiesta diferencias significativas en los distintos medios de cultivo. Es decir, que el medio “MsM” favorece la formación de brotes en ambos ecotipos y la variación de medios de cultivo solo afecta al ecotipo Colorado de Mendoza, estimulando en el, la formación de brotes adventicios, mientras que el Rosado de Italia responde de igual manera a esta variación. Por tanto se puede indicar que los factores no son independientes, es decir en cuanto el factor (B) medios de multiplicación cambia al medio “MsM”, el factor (A) ecotipos (en especial el Colorado de Mendoza) modifica su comportamiento produciendo mayor número de brotes.

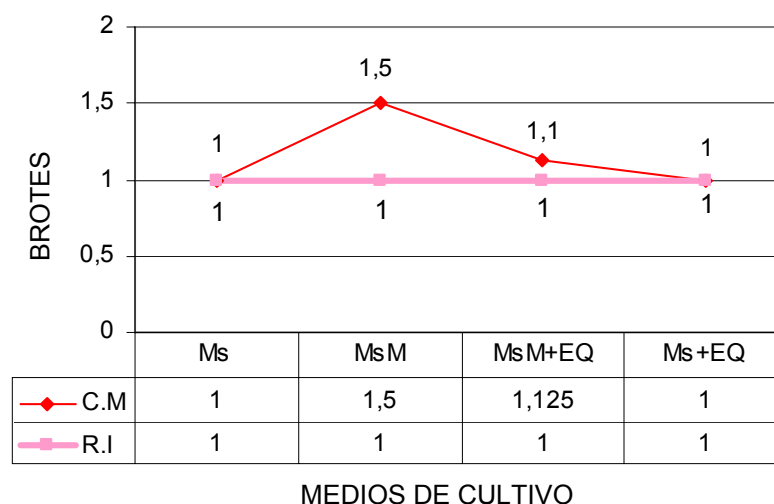


Figura 38. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación de medios de multiplicación (factor B) para la variable número de brotes.

En la figura 38 se observa la interacción ecotipos (factor A) por (factor B) medios de multiplicación donde se aprecia que, el ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó el mayor número de brotes (1.5 en promedio) en presencia del el medio “MsM”, en comparación al medio “MsM +EQ” que obtuvo 1.25 brotes en promedio. El ecotipo Rosado de Italia fue el que alcanzó el menor promedio en cuanto al número de brotes (1). En presencia de los medios “Ms” , “MsM”, “MsM +EQ” y “Ms +EQ” su comportamiento en relación al número de brotes fue el mismo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Quezada (1999), en un estudio similar, indicando que, el ecotipo que desarrolló mayor número de brotes, y por tanto mejor multiplicación, fue el Colorado de Mendoza.

El análisis realizado indica que el medio de multiplicación “MsM” reúne las condiciones más favorables para promover el desarrollo de brotes, debido a este resultado es necesario explicar el efecto que causa el extracto de quinua en el medio “MsM” donde, a medida que se suministrado en los medios de cultivo, el número de brotes disminuye. Para explicar este comportamiento se realizó el análisis entre los medios “Ms” y “Ms+EQ” siendo la principal diferencia entre ellos la presencia del extracto de quinua, asimismo se analizó los medios “MsM” y “MsM+EQ” siendo el factor diferencia, la presencia del extracto de quinua, describiendo los siguientes resultados a continuación.

Cuadro 35. Análisis de regresión lineal para los medios “MsM” y “MsM + EQ” para la variable número de brotes

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	2	-0.5	-1	1	y = 2 + -0.5 x
Rosado de Italia	-	-	-	-	-

Fuente = Elaboración propia

El análisis de regresión lineal del cuadro 35, indica que, a medida que se suministra extracto de quinua en el medio “MsM” el número de brotes disminuye, el coeficiente de determinación “r²” indica que el descenso en el número de brotes es consecuencia del extracto de quinua en un 100%, así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe una alta correlación negativa entre el extracto de quinua y el número de brotes. Se puede esperar que a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua, el número de brotes disminuirá considerablemente. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada unidad de extracto de quinua suministrado al medio “MsM” el número de brotes disminuirá en 0.5 en el ecotipo Colorado de Mendoza.

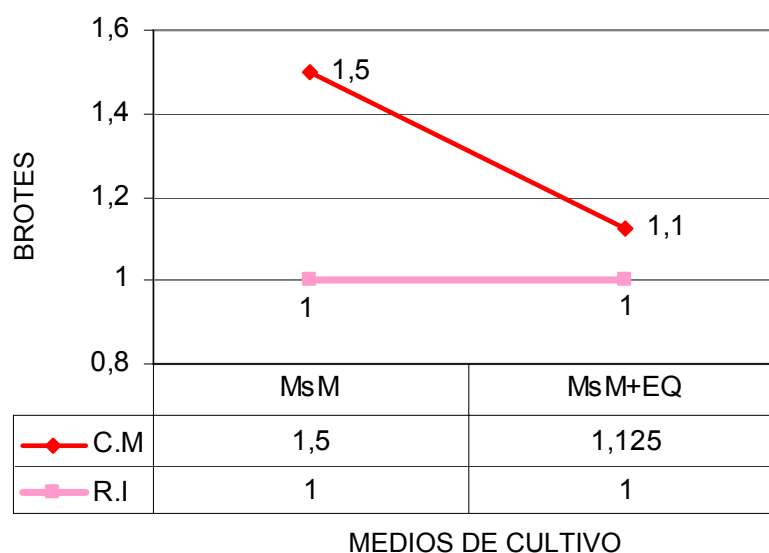


Figura 39. Variación en el número de brotes por efecto del extracto de quinua en los medios “Ms” y “Ms + EQ”.

El extracto de quinua no provoca variación para el ecotipo Rosado de Italia, es de esperar que a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua, el número de brotes se mantenga en uno. Al respecto Conci (1997), Indica que tasa de multiplicación en ajo es variable, según el tipo de cultivo se puede esperar alrededor 1/6 brotes cada 8 semanas (es decir 1 vitroplanta de cada seis desarrolla brotes cada ocho semanas).

Del mismo modo se analizó el efecto del extracto de quinua suministrado al medio “Ms” demostrando que, a medida que se aumente la proporción de extracto de quinua, el número de brotes se mantiene en uno. Es decir que, el extracto de quinua no favorece al desarrollo de brotes, por tanto solo el ecotipo Rosado de Italia generó un brote por cada vitroplanta, corroborando lo mencionado por Pierik (1990), indicando que la capacidad de regeneración de brotes viene determinada por el genotipo, el suministro de nutrientes, reguladores de crecimiento y el estado fisiológico de la vitroplanta.

Sin embargo los resultados obtenidos con la utilización del medio “MsM” fueron todavía insuficientes para justificar la etapa de multiplicación, por tanto, en una simultanea investigación se utilizó como medio basal el “MsM” más la acción de Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L) donde el número de brotes por vitroplanta aumentó satisfactoriamente. Además debe considerarse que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable, ayuda a la formación de brotes, de lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Smith, 1992; Dixon, 1994).

Esta investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar con 26 repeticiones por tratamiento, donde los factores de estudio fueron los ecotipos (Colorado de Mendoza y Rosado de Italia), bajo el efecto de los reguladores de crecimiento Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L) presentando los siguientes resultados:

Cuadro 36. Análisis de varianza para el número de brotes bajo el efecto de Kin (1mg/L) y AIA (2 mg /L).

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	16.173	16.173	121.53	7.19 (**)
Error	50	6.6538	0.133		
TOTAL	51	22.892			

(**) = Altamente significativo al 1%
NS = No significativo estadísticamente.

CV= 23.42%

El coeficiente de variación del cuadro 36 indica un 23.42% de variación, demostrando la confiabilidad de los resultados obtenidos para esta investigación. También se observó que los resultados obtenidos comprueban la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia a un nivel de significancia del 1%.

La prueba rango múltiple de Duncan confirma la existencia de diferencias significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia bajo el efecto de Kin (1mg/L) y AIA (2 mg/L). En el cuadro 37, se observa la comparación de medias para el número de brotes a un nivel de significancia del 1%, donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio de 2.1 brotes por encima del Rosado de Italia, que obtuvo un promedio menor de 1 brote por cada vitroplanta.

Cuadro 37. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el número de brotes.

ECOTIPOS	PROMEDIO	* DUNCAN
Colorado de Mendoza	2.1	A
Rosado de Italia	1	B

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

Al respecto Hurtado y Merino (1997), señalan que, la presencia auxinas (AIA) y citicininas (Kin), favorecen al desarrollo de brotes adventicios. Sin embargo se inactivan fácilmente por la luz y enzimas celulares, por lo que su uso es limitado (Mejia, 1988).

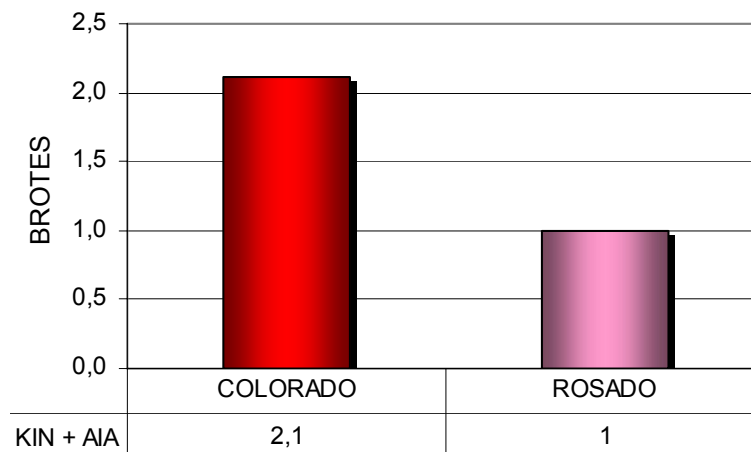


Figura 40. Comparación de medias para la variable número de brotes bajo el efecto de Kin (1mg/L) y AIA (2 mg/L) en el medio MsM = Sales de Murashige & Skoog modificado (sustitución de KNO₃, MgSO₄, NH₄NO₃),

5.3 Etapa de microbulbificación.

Esta fase tuvo por finalidad la obtención de microbulbillos evaluados a las siete semanas de siembra (42 días) las variables planteadas para esta etapa fueron evaluadas con mucho detalle. Se utilizó el “MsM” como medio basal puesto que demostró ser el medio que ofrece las mejores condiciones, a el se adicionaron las diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 6%, 9%, y 12%) detallando los siguientes resultados a continuación.

5.3.1 Número de microbulbillos.

Se contabilizó el número de microbulbillos por cada vitroplanta, donde el análisis de fuentes de variación determino los siguientes resultados.

Cuadro 38. Análisis de varianza para el número de microbulbillos.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	0.015662	0.01562	1.00	7.12 NS
Concentraciones de sacarosa (B)	3	0.046875	0.01562	1.00	4.14 NS
Interacción (AxB)	3	0.046875	0.01562	1.00	4.16 NS
Error	56	0.875	0.01562		
TOTAL	63				

NS = Estadísticamente no existe diferencias significativas al 1%

CV= 12.31%

El análisis de varianza para el número de microbulbillos (cuadro 38) indica un coeficiente de variación del 12.31% lo que indica la confiabilidad de los resultados obtenidos para esta investigación.

De esta manera podemos indicar que no existen diferencias significativas entre los ecotipos de ajo con relación a la formación de microbulbillos. En el cuadro 39, se observa la comparación de medias por prueba de Duncan a un nivel de significancia del 1% donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio general de 1.03 microbulbillos. Asimismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio general de 1 microbulbillo por cada vitroplanta.

Cuadro 39. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el número de microbulbillos.

ECOTIPOS	PROMEDIO	* DUNCAN
Colorado de Mendoza	1.03	A
Rosado de Italia	1.0	A

* / Letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencias.

Para el factor (B), podemos indicar que no se registraron diferencias entre las distintas concentraciones de sacarosa, ya que ninguna de ellas promovió eficientemente el desarrollo de microbulbillos. La prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% confirma este resultado donde la concentración de sacarosa al 6% obtuvo un microbulbillo más que las demás concentraciones como se detalla en el cuadro 39 y la figura 43.

Cuadro 40. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan 1% para el número de brotes.

MEDIOS DE CULTIVO	PROMEDIO	* DUNCAN
6 % de sacarosa	1.06	A
3 % de sacarosa	1.00	A B
9 % de sacarosa	1.00	A B C
12 % de sacarosa	1.00	A B C

* / Letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencias.

De acuerdo al cuadro 38 no se encontró significancia entre (A x B) la interacción, ecotipos de ajo (factor A) y concentraciones de sacarosa (factor B). Por tanto, los factores son independientes uno del otro, es decir cuando los niveles de sacarosa (factor B) varían, el factor (A) ecotipos no es afectado por este cambio.

Vicente (2008), indica que, el hecho de no hallar diferencias significativas, refleja que los elementos en estudio, están influenciados por otro tipo de factores, que restringen su expresión, como ser temperatura, luz, fotoperiodo, humedad.

Sin embargo una de las diez repeticiones al 6% de sacarosa obtuvo 2 microbulbillos por vitroplanta, los promedios se aprecian en la figura 41.

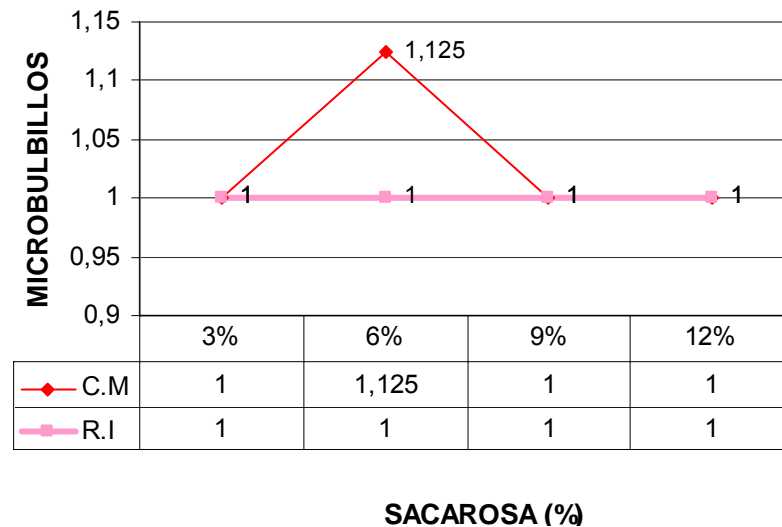


Figura 41. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según los diferentes concentraciones de sacarosa (factor B) para la variable número de microbulbillos.

Al respecto Ravnikar *et al.* (1993) recomienda el uso de ácido jasmónico (aproximadamente 1 mg/L) ya que en una de sus investigaciones, este compuesto generaba bulbos. Pero este factor depende también de las características fisiológicas de cada ecotipo.

Quezada (1999), en un estudio similar indica que, el único medio que generó adicionalmente microbulbillos, fue el que contenía 1 mg/L de ácido jasmónico pero solamente en el ecotipo Rosado de Italia.

5.3.2 Diámetro de microbulbillo.

Las vitroplantas respondieron favorablemente al proceso bulbificación obteniendo de esta forma microbulbillos en ellos se midió el diámetro ecuatorial (medido en mm. por un calibrador pálmer) en condiciones *ex vitro*, la evaluación para esta variable se realizó a los 42 días demostrando los siguientes resultados.

Cuadro 41. Análisis de varianza para el diámetro de microbulbillos.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	62.016	62.016	75.40	7.12**
Concentraciones de sacarosa (B)	3	100.263	33.421	40.63	4.14**
Interacción. (AxB)	3	12.125	4.041	4.914	4.16**
Error	56	46.054	0.822		
TOTAL	63	220.45			

(**) = Altamente significativo al 1%

CV= 14.50%

El análisis de fuentes de variación para el diámetro de microbulbillos (cuadro 41) indica un coeficiente de variación de 14.50 % lo que demuestra la confiabilidad de los resultados obtenidos y la precisión al momento de evaluar esta variable.

Asimismo podemos indicar la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos de ajo con relación al diámetro de microbulbillos (factor A), es decir que los diámetros obtenidos entre ecotipos son diferentes al 1% de sensibilidad estadística. En el cuadro 42, se observa la comparación de medias por prueba de Duncan a un nivel de significancia del 1% donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio general de 5.3 mm. Asimismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio mayor de 7.2 mm por cada vitroplanta.

De acuerdo con Darías (1993); citado por Quezada (1999), esta diferencia en el diámetro de microbulbillos es atribuible a las características fisiológicas propia de cada ecotipo y a las diferentes concentraciones de sacarosa suministradas.

Cuadro 42. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el diámetro de microbulbillos.

ECOTIPOS	PROMEDIO(mm)	* DUNCAN
Rosado de Italia	7.2	A
Colorado de Mendoza	5.3	B

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

Para el factor (B) medios de bulbificación, podemos indicar que existen diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones de sacarosa como podemos apreciar en la figura 42.

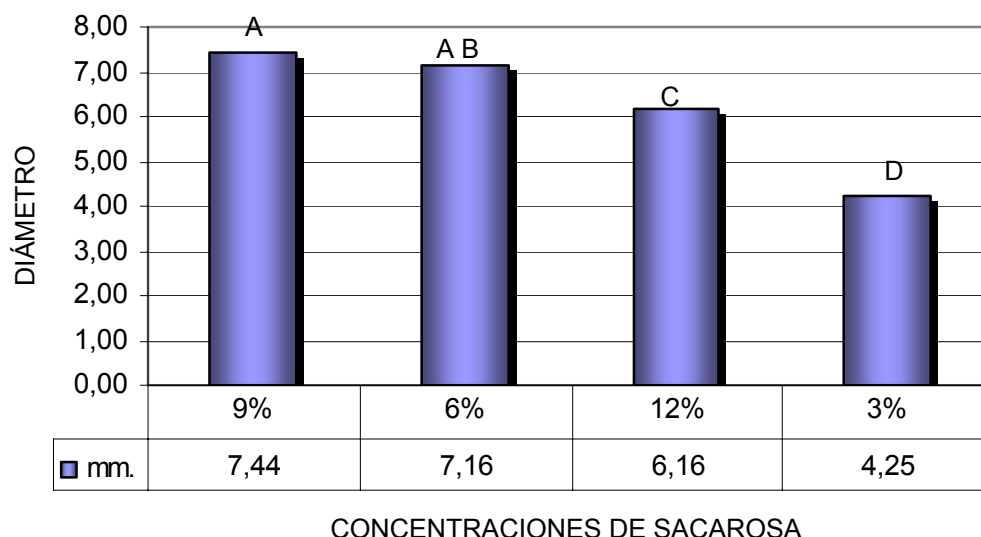


Figura 42. Comparación de medias para la variable diámetro de microbulbillo por efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 6%, 9%, y 12%).

La prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% indica que las concentraciones 9% y 6% no demuestran diferencias, alcanzando los máximos promedios 7.44 y 7.16 mm respectivamente, estas concentraciones demuestran ser las más favorables para inducir el proceso de bulbificación. También se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones 12% y 3% alcanzando promedios menores de 6.16 y 4.25 mm respectivamente.

Cuadro 43. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan para el diámetro de microbulbillos.

MEDIOS DE BULBIFICACIÓN	PROMEDIO (mm)	* DUNCAN
9 % de sacarosa	7.44	A
6 % de sacarosa	7.16	A B
12 % de sacarosa	6.16	C
3 % de sacarosa	4.25	D

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

La variable diámetro de microbulbillo (cuadro 41) demostró también la existencia de diferencias altamente significativas entre la interacción ecotipos de ajo (factor A) y medios de bulbificación (factor B) por tanto la interpretación de los resultados de esta fase se realizó mediante análisis de efectos simples para la interacción.

Cuadro 44. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable diámetro de microbulbillo.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
A (b1) 3% de sacarosa	1	5.522	5.522	6.71	7.126 NS
A (b2) 6% de sacarosa	1	31.64	31.64	38.47	7.126 (**)
A (b3) 9% de sacarosa	1	32.775	32.775	39.85	7.126 (**)
A (b4) 12% de sacarosa	1	4.2025	4.2025	5.11	7.126 NS
B (a1) Colorado	3	42.481	14.16	17.21	4.16 (**)
B (a2) Rosado	3	69.907	23.30	28.33	4.16 (**)
ERROR	56	46.054	0.8223		
TOTAL	66				

(**) = Altamente significativo al nivel 1%

NS = No significativo estadísticamente.

El análisis de efectos simples (Cuadro 44.), confirma que, se encontraron diferencias significativas entre los ecotipos (factor A) a una concentración de 6% y 9% de sacarosa y no así para las concentraciones 3% y 12% esto significa que para inducir la bulbificación las concentraciones de sacarosa deberán fluctuar entre 6 y 9% .Para ambos ecotipos factor (B) se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de sacarosa por lo tanto, la bulbificación de los ecotipos de ajo esta en directa relación con, las concentraciones de sacarosa suministrada.

Gómez (2008), indica que, una sobresaturación de sacarosa en el medio de cultivo, induce a un desequilibrio osmótico, produciendo microbulbillos de menor diámetro y anómalos. Asimismo Quezada (1999), indica que, es posible aumentar la concentración de sacarosas mediante la utilización del medio "MS +B5" (medio basal de Gambort, 1968) donde la cantidad de macro y micro nutrientes es variable, permitiendo el aumento de la concentración de sacarosa.

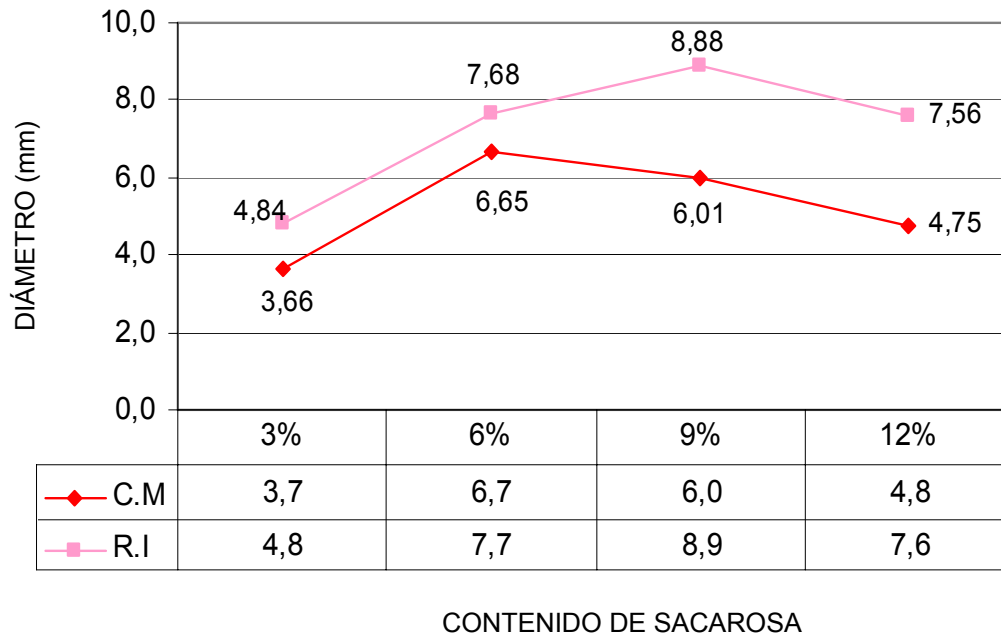


Figura 43. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación en las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12% (factor B) para la variable diámetro de microbulbillo.

En la figura 43 se observa la interacción ecotipos (factor A) por (factor B) concentraciones de sacarosa donde se aprecia que el ecotipo Rosado de Italia alcanzó el mayor diámetro de microbulbillo (8.9 mm) a una concentración del 9% de sacarosa mientras que al 3% obtuvo un diámetro menor (4.8 mm) en promedio. El ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó un promedio de 6.7 mm como máximo a una concentración del 6% de sacarosa mientras que al 3% obtuvo su menor diámetro (3.7 mm).

De acuerdo con estos resultados se puede indicar que el ecotipo Colorado de Mendoza alcanza su máximo diámetro a una concentración del 6% de sacarosa, pasado este porcentaje el diámetro de microbulbillo disminuye considerablemente. El ecotipo Rosado de Italia alcanza su máximo diámetro a una concentración del 9% de sacarosa, pasado este porcentaje el diámetro de microbulbillo tiende a disminuir, probablemente producto de una sobre saturación de carbono en el medio de cultivo (Mendoza, 2008).

Para explicar este comportamiento de forma más detallada se analizó el grado de correlación que existe entre las diferentes concentraciones de sacarosa (3%,6%,9%,12%).

con relación al diámetro de microbulbillo. Para esta etapa los resultados se describen a continuación.

Cuadro 45. Análisis de regresión lineal para las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%.

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	4.61	0.08	0.25	0.065	y = 4.61 + 0.08x
Rosado de Italia	4.9	0.31	0.7	0.5	y = 4.9 + 0.31x

Fuente = Elaboración propia

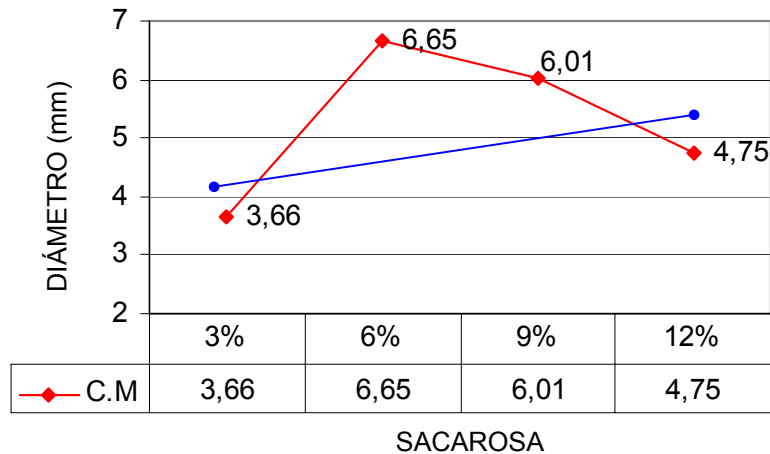


Figura 44. Variación del diámetro de microbulbillo del ecotipo Colorado de Mendoza por efecto de las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%”.

El análisis de regresión lineal del cuadro 45 confirma que, a medida que se aumenta la concentración de sacarosa (hasta el 6%) para el ecotipo Colorado de Mendoza el diámetro de microbulbillo aumenta, pasado esa concentración el diámetro disminuye considerablemente. El coeficiente de determinación “r²” indica que el aumento en el diámetro es consecuencia del porcentaje de sacarosa en un 65%, el restante 35% se debe a otros factores, según Darías (1993), la temperatura, fotoperiodo y las características fisiológicas propias de cada ecotipo. Así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe una asociación positiva entre las concentraciones de sacarosa y el aumento en el diámetro de microbulbillo. Se puede esperar que a medida

que se aumente la concentración de sacarosa hasta el 6%, el diámetro de microbulbillo aumentara. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada mg. de sacarosa suministrado al medio de bulbificación el diámetro de microbulbillo aumenta en 0.08 mm.

De la misma manera se realizó el análisis de regresión lineal para el ecotipo Rosado de Italia, donde el diámetro de microbulbillo aumenta hasta una concentración del 9% de sacarosa, pasado esa concentración el diámetro disminuye considerablemente. El coeficiente de determinación “ r^2 ” indica que el aumento en el diámetro es consecuencia del porcentaje de sacarosa en un 50%, el restante 50% se debe a otros factores como ser la temperatura, fotoperiodo y las características fisiológicas propias de cada ecotipo. Así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe asociación positiva entre las concentraciones de sacarosa y el aumento en el diámetro de microbulbillo. Se puede esperar que a medida que se aumente la concentración de sacarosa hasta el 9%, el diámetro de microbulbillo aumentará. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada mg. de sacarosa suministrado al medio de bulbificación el diámetro de microbulbillo aumenta en 0.31 mm.

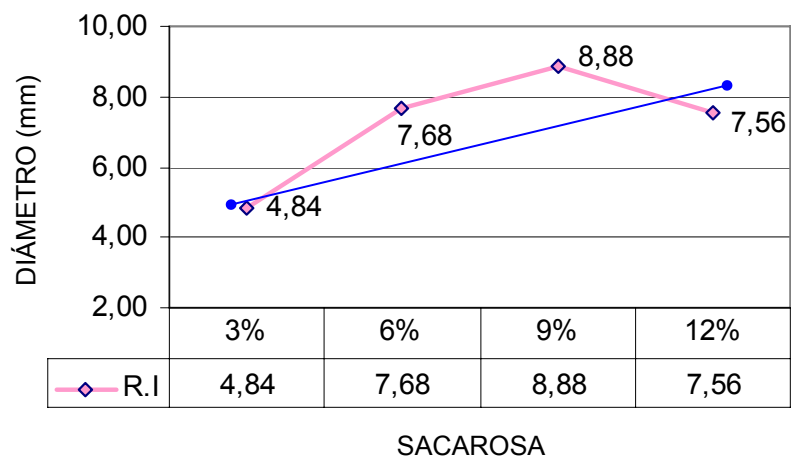


Figura 45. Variación del diámetro de microbulbillo del ecotipo Rosado de Italia por efecto de las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9% y 12%.

Gómez (2008), indica que, es importante evaluar los factores que también influyen en el proceso de bulbificación (temperatura, fotoperiodo, humedad, genotipo), puesto que el efecto de estos factores resultan ser determinantes al momento de inducir la bulbificación.

5.3.3 Diámetro de microbulbillos curados.

El proceso de curado conlleva el sometimiento de los microbulbillos (*ex vitro*) a temperatura ambiente por el lapso de 72 hrs. lo que provoca la desecación de las hojas externas (catafilas), pasado esta etapa se midió el diámetro ecuatorial de cada microbulbillo curado (medido en mm por un calibrador pálmer) donde los resultados obtenidos se describen a continuación.

Cuadro 46. Análisis de varianza para el diámetro de microbulbillos curados.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	57.002	57.002	69.66	7.12 (**)
Concentraciones de sacarosa (B)	3	97.841	32.613	39.85	4.14 (**)
Interacción (A x B)	3	10.468	3.489	4.264	4.16 (**)
Error	56	45.824	0.8183		
TOTAL	63	211.137			

(**) = Altamente significativo al 1%
NS = No significativo estadísticamente.

CV= 15.32%

El coeficiente de variación del cuadro 46 indica un 15.32% de variación, demostrando la confiabilidad de los resultados obtenidos para esta investigación. También se observó que los resultados obtenidos comprueban la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia (factor A) a un nivel de significancia del 1%.

La prueba rango múltiple de Duncan confirma la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia. En el cuadro 47, se observa la comparación de medias para el diámetro de microbulbillos curados, a un nivel de significancia del 1%, donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio menor de 4.95 mm. Del mismo modo mismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio mayor de 6.85 mm por cada microbulbillo.

Arguello (2000), indica que en la etapa de curado, es suficiente la desecación de la hoja más externa del bulbo, lo que proporciona la protección necesaria, favoreciendo el proceso de dormancia.

Cuadro 47. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el diámetro de microbulbillos curados.

ECOTIPOS	PROMEDIO (mm)	* DUNCAN
Rosado de Italia	6.85	A
Colorado de Mendoza	4.96	B

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

Para el factor (B) medios de bulbificación, podemos indicar que existen diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones de sacarosa como podemos apreciar en la figura 46.

La prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% indica que las concentraciones 9% y 6% no demuestran diferencias, alcanzando los máximos promedios 7.11 y 6.83 mm respectivamente, estas concentraciones demuestran ser las más favorables para inducir el proceso de bulbificación. También se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones 12% y 3% alcanzando promedios menores de 5.74 y 3.96 mm respectivamente.

Cuadro 48. Diferencias entre medios de cultivo por prueba de Duncan (1%) para el diámetro de microbulbillos curados.

MEDIOS DE BULBIFICACIÓN	PROMEDIO (mm)	* DUNCAN
9 % de sacarosa	7.11	A
6 % de sacarosa	6.83	A B
12 % de sacarosa	5.74	C
3 % de sacarosa	3.96	D

* / Letras iguales indican que estadísticamente no existe diferencias.

Como se puede apreciar en la figura 46 el medio de bulbificación al 9% alcanzó el máximo diámetro de microbulbillo curado 7.1 mm mientras que a una concentración del 6% se obtuvo un diámetro de 6.8 mm sin embargo estas dos concentraciones no muestran diferencias significativas en comparación a las concentraciones 12% y 3% obteniendo resultados de 5.7 mm y 3.9 mm respectivamente.

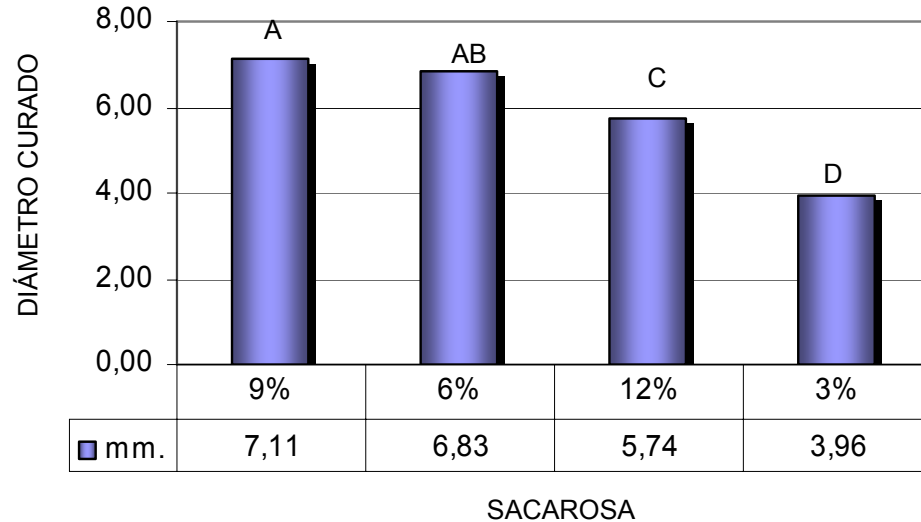


Figura 46. Comparación de medias para la variable diámetro de microbulbillo curado por efecto de las diferentes concentraciones de sacarosa (3%, 6%, 9%, y 12%)

La variable diámetro de microbulbillo curado (cuadro 46) demostró también la existencia de diferencias altamente significativas entre la interacción ecotipos de ajo (factor A) y medios de bulbificación (factor B) por lo tanto la interpretación de los resultados de esta fase se realizó mediante análisis de efectos simples detallado a continuación.

Cuadro 49. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable diámetro de microbulbillo curado.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
A (b1) 3% de sacarosa	1	5.4056	5.4056	6.60	7.126 NS
A (b2) 6% de sacarosa	1	28.09	28.09	34.32	7.126 (**)
A (b3) 9% de sacarosa	1	29.97	29.97	36.62	7.126 (**)
A (b4) 12% de sacarosa	1	4.00	4.00	4.88	7.126 NS
B (a1) Colorado	3	42.237	14.07	17.19	4.16 (**)
B (a2) Rosado	3	66.07	22.024	26.91	4.16 (**)
ERROR	56	45.824	0.8183		
TOTAL	66				

(**) = Altamente significativo al nivel 1%
 NS = No significativo estadísticamente.

El análisis de efectos simples (Cuadro 49), muestra que se encontraron diferencias significativas entre los ecotipos (factor A) a una concentración de 6% y 9% de sacarosa y no así para las concentraciones 3% y 12% esto significa que para promover uno eficiente curado de microbulbillo, las concentraciones de sacarosa deberán fluctuar entre 6 y 9% Para ambos ecotipos factor (B) se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de sacarosa, por lo tanto, el diámetro de microbulbillo curado está en directa relación con las concentraciones de sacarosa suministradas

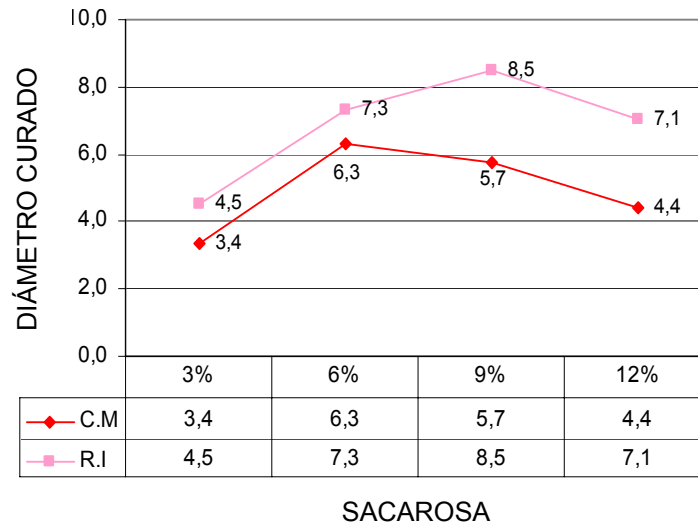


Figura 47. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación en las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12% (factor B) para la variable diámetro de microbulbillo curado.

En la figura 47 se observa la interacción ecotipos (factor A) por (factor B) concentraciones de sacarosa donde se aprecia que el ecotipo Rosado de Italia alcanzó el mayor diámetro de microbulbillo curado (8.5 mm) a una concentración del 9% de sacarosa mientras que al 3% obtuvo un diámetro (4.5 mm) en promedio. El ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó un promedio de (6.3 mm) como máximo a una concentración del 6% de sacarosa mientras que al 3% obtuvo su menor diámetro (3.4 mm).

De acuerdo con estos resultados se puede indicar que el ecotipo Colorado de Mendoza alcanza su máximo diámetro curado a una concentración del 6% de sacarosa, pasado este porcentaje el diámetro de microbulbillo disminuye considerablemente. El ecotipo Rosado de Italia alcanza su máximo diámetro curado a una concentración del 9% de sacarosa, pasado este porcentaje el diámetro de microbulbillo tiende a disminuir.

Quezada (1999), menciona que el curado es una rápida desecación de las hojas externas para proteger la hoja de reserva y el brote, de posibles ataques de patógenos, además que esta variable servirá para confirmar los resultados que se obtuvieron con el diámetro de los microbulbillos *ex vitro*.

Para explicar este comportamiento de forma más detallada se analizó el grado de correlación que existe entre las diferentes concentraciones de sacarosa (3%,6%,9%,12%) con relación al diámetro de microbulbillo curado. Para esta etapa los resultados se describen a continuación.

Cuadro 50. Análisis de regresión lineal para las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%.

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	4.34	0.083	0.24	0.059	$y = 4.34 + 0.083x$
Rosado de Italia	4.67	0.29	0.67	0.45	$y = 4.9 + 0.31x$

Fuente = Elaboración propia

El análisis de regresión lineal del cuadro 50 indica que, a medida que se aumenta la concentración de sacarosa (hasta el 6%) para el ecotipo Colorado de Mendoza el diámetro de microbulbillo aumenta, pasado esa concentración el diámetro disminuye considerablemente. El coeficiente de determinación “r²” indica que el diámetro de microbulbillo curado es consecuencia del porcentaje de sacarosa en un 59%, el restante 41% se debe a factores como ser la temperatura ambiente que se proporciona al microbulbillo después de las condiciones *in vitro*, además de las características fisiológicas propias de cada ecotipo. Así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe una asociación positiva entre las concentraciones de sacarosa y el diámetro de microbulbillo curado. Se puede esperar que a medida que se aumente la concentración de sacarosa hasta el 6%, el diámetro de microbulbillo aumentará. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada mg. de sacarosa suministrado al medio de bulbificación el diámetro de microbulbillo aumenta en 0.083 mm.

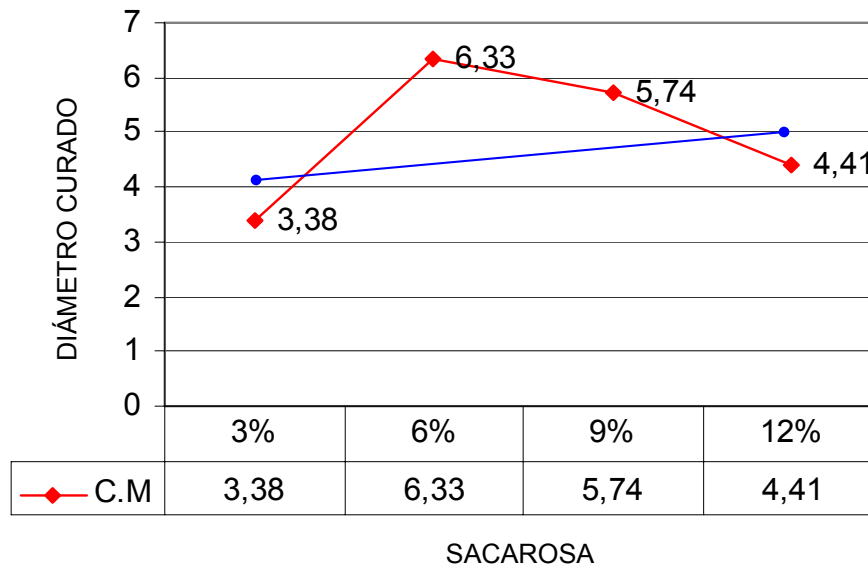


Figura 48. Variación del diámetro de microbulbillo curado del ecotipo Colorado de Mendoza por efecto de las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%.

De la misma manera se realizó el análisis de regresión lineal para el ecotipo Rosado de Italia, donde el diámetro de microbulbillo aumenta, hasta una concentración del 9% de sacarosa pasado esa concentración el diámetro disminuye considerablemente. El coeficiente de determinación “ r^2 ” indica que el diámetro de microbulbillo curado es consecuencia del porcentaje de sacarosa en un 45%, demostrando que el restante 55% se debe a factores propios del curado de microbulbillo como ser la temperatura ambiente, y sus propias características fisiológicas. Así mismo el coeficiente de correlación “ r ” indica que existe una asociación positiva entre las concentraciones de sacarosa y el aumento en el diámetro de microbulbillo. Se puede esperar que a medida que se aumente la concentración de sacarosa hasta el 9%, el diámetro de microbulbillo aumentará. El coeficiente de regresión “ b ” indica que por cada mg de sacarosa suministrado al medio de bulbificación el diámetro de microbulbillo aumenta en 0.29 mm.

El resultado de un buen curado se verifica prácticamente cuando el bulbo no posee olores extraños (causado por hongos o bacterias), ni manchas sobre los dientes, el falso tallo debe tener un diámetro reducido (Burba, 1991).

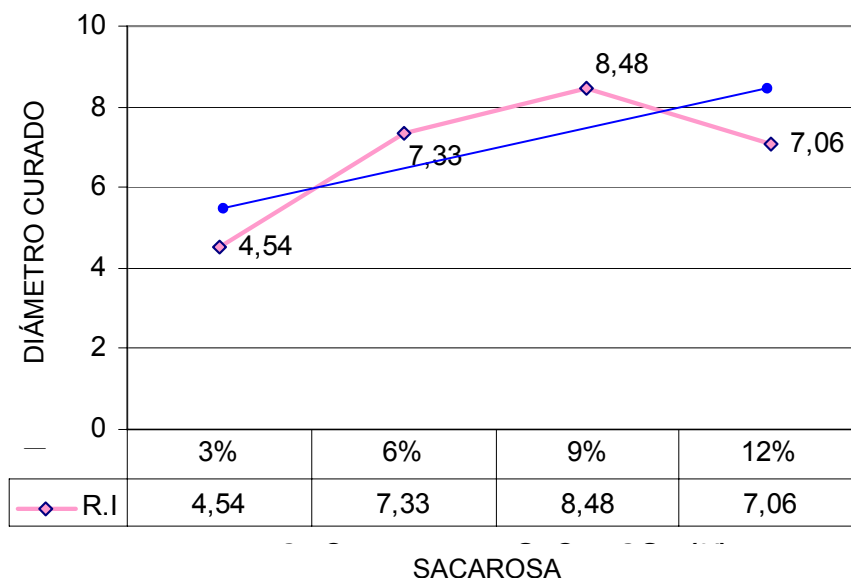


Figura 49. Variación del diámetro de microbulbillo curado del ecotipo Rosado de Italia por efecto de las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%”.

5.3.4 Peso de microbulbillos *ex vitro*.

Posterior al curado se pesó cada microbulbillo por separado, mediante una balanza analítica la evaluación para esta variable se realizó a los 45 días demostrando los siguientes resultados.

Cuadro 51. Análisis de varianza para peso de microbulbillos *ex vitro*.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
Ecotipos (A)	1	1.257	1.257	129.59	7.12(**)
Concentraciones de sacarosa (B)	3	0.3625	0.120	12.455	4.14(**)
Interacción. (AxB)	3	0.2917	0.097	10.023	4.16(**)
Error	56	0.5433	0.0097		
TOTAL	63	2.455			

(**) = Altamente significativo al 1%

CV= 28.69%

El análisis de fuentes de variación para el peso de microbulbillos *ex vitro* (cuadro 51) indica un coeficiente de variación de 28.69 % lo que demuestra la confiabilidad de los resultados obtenidos al momento de evaluar esta variable.

Asimismo podemos indicar la existencia de diferencias altamente significativas entre los ecotipos de ajo (factor A), con relación peso de microbulbillos *ex vitro* es decir que el peso obtenido entre ecotipos son diferentes al 1% de sensibilidad estadística. En el cuadro 52, se observa la comparación de medias por prueba de Duncan a un nivel de significancia del 1% donde el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo un promedio general de 0.20 gr. Asimismo el ecotipo Rosado de Italia, obtuvo un promedio mayor de 0.48 gr. por cada microbulbillo.

Cuadro 52. Diferencias entre ecotipos por prueba de Duncan (1%) para el peso de microbulbillos *ex vitro*.

ECOTIPOS	PROMEDIO (gr.)	* DUNCAN
Rosado de Italia	0.48	A
Colorado de Mendoza	0.20	B

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

Para el factor (B) medios de bulbificación, podemos indicar que existen diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones de sacarosa como podemos apreciar el cuadro 51.

La prueba de rango múltiple de Duncan al nivel 1% indica que las concentraciones 9% y 6% no demuestran diferencias con respecto al peso de microbulbillos, alcanzando los máximos promedios 0.44 y 0.36 gr. respectivamente, estas concentraciones demuestran ser las más favorables para inducir el proceso de bulbificación. Asimismo no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones 6% y 12% alcanzando promedios de 0.36 y 0.34 gr respectivamente. La concentración 3% de sacarosa muestra diferencias significativas con respecto a las demás concentraciones, siendo su peso el más bajo promedio registrado 0.23 gr.

De acuerdo con Darías (1993); citado por Quezada (1999), esta diferencia en el peso es atribuible a las diferentes concentraciones de sacarosa suministradas y las características genotípicas propias de cada ecotipo.

Cuadro 53. Diferencias entre medios de bulbificación por prueba de Duncan (1%) para el peso de microbulbillos *ex vitro*.

MEDIOS DE BULBIFICACIÓN	PROMEDIO (gr.)	* DUNCAN
9 % de sacarosa	0.44	A
6 % de sacarosa	0.36	A B
12 % de sacarosa	0.34	B C
3 % de sacarosa	0.23	D

* / Letras desiguales indican que estadísticamente existe diferencias.

La variable peso de microbulbillo (cuadro 51) demostró también la existencia de diferencias altamente significativas entre la interacción ecotipos de ajo (factor A) y medios de bulbificación (factor B) por lo tanto, la interpretación de los resultados para esta variable se realizó mediante análisis de efectos simples para la interacción.

Cuadro 54. Efectos simples para la interacción ecotipos (A) por medios de multiplicación (B) para la variable peso de microbulbillo.

FUENTES DE VARIACIÓN.	GL	SC	CM	Fc	Ft
A (b1) 3% de sacarosa	1	0.0689	0.0689	7.10	7.126 NS
A (b2) 6% de sacarosa	1	0.102	0.102	10.51	7.126 (**)
A (b3) 9% de sacarosa	1	0.688	0.688	70.92	7.126 (**)
A (b4) 12% de sacarosa	1	0.688	0.688	70.92	7.126 (**)
B (a1) Colorado	3	0.1136	0.0378	3.814	4.16 NS
B (a2) Rosado	3	0.5410	0.1803	18.55	4.16 (**)
ERROR	56	0.5433	0.0097		
TOTAL	66				

(**) = Altamente significativo al nivel 1%
NS = No significativo estadísticamente.

El análisis de efectos simples (Cuadro 54), muestra que se encontraron diferencias significativas entre los ecotipos (factor A) a una concentración del 6%, 9% y 12% de sacarosa y no así para la concentración 3% esto significa que para inducir la variación en el peso de microbulbillos las concentraciones de sacarosa deberán fluctuar entre 6%,9 % y 12% .Los medios de bulbificación (B) ejercen diferencias significativas entorno al peso para el ecotipo Rosado de Italia, mientras que el ecotipo Colorado de Mendoza el peso de microbulbillo es semejante en los medios de bubificación por lo tanto la

bulbificación de los ecotipos de ajo esta en directa relación con las concentraciones de sacarosa suministradas. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Ravnikar (1993), quien investigó la acción de la sacarosa en la formación de microbulbillos, comprobando que las concentraciones 6 y 9 % son las más apropiadas para inducir la variación en el peso de microbulbillos.

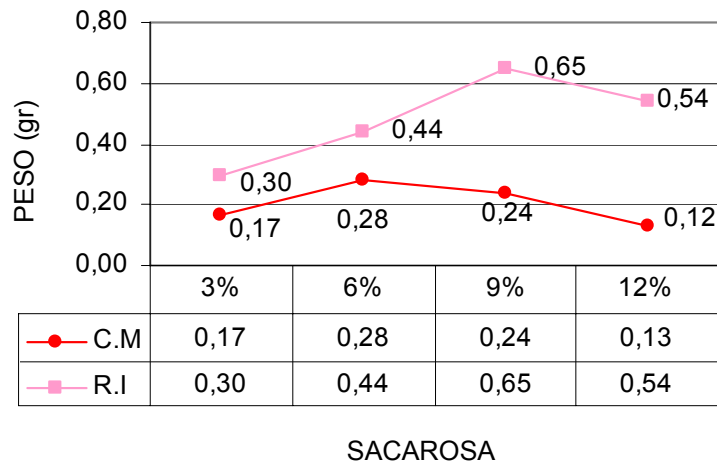


Figura 50. Comportamiento de los ecotipos (factor A) según la variación en las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12% (factor B) para la variable peso de microbulbillo *ex vitro*.

En la figura 50 se observa la interacción ecotipos (factor A) por (factor B) concentraciones de sacarosa donde se aprecia que el ecotipo Rosado de Italia alcanzó el mayor peso de microbulbillo (0.65 gr) a una concentración del 9% de sacarosa, mientras que, al 3% obtuvo un peso de (0.30 gr) en promedio. El ecotipo Colorado de Mendoza alcanzó un promedio de (0.28 gr) como máximo a una concentración del 6% de sacarosa mientras que al 3% obtuvo un peso menor de 0.17 gr.

De acuerdo con estos resultados se puede indicar que el ecotipo Colorado de Mendoza alcanza su máximo peso a una concentración del 6% de sacarosa, pasado este porcentaje el peso de microbulbillo disminuye considerablemente. El ecotipo Rosado de Italia alcanza su máximo peso a una concentración del 9% de sacarosa, pasado este porcentaje el peso de microbulbillo tiende a disminuir, según Mendoza (2008), probablemente producto de una sobre saturación de carbono en el medio de cultivo.

Para explicar este comportamiento de forma más detallada, se analizó el grado de correlación que existe entre las diferentes concentraciones de sacarosa (3%,6%,9%,12%”) en los medios de bulbificación con relación al peso de microbulbillo. Para esta etapa los resultados se describen a continuación.

Cuadro 55. Análisis de regresión lineal para las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%.

ECOTIPOS	COEFICIENTES				ECUACIÓN DE AJUSTE
	a	b	r	r ²	
Colorado de Mendoza	0.24	- 0.005	- 0.30	0.095	y = 0.24 + -0.005x
Rosado de Italia	0.25	0.031	0.8	0.65	y = 0.25 + 0.031x

Fuente = Elaboración propia

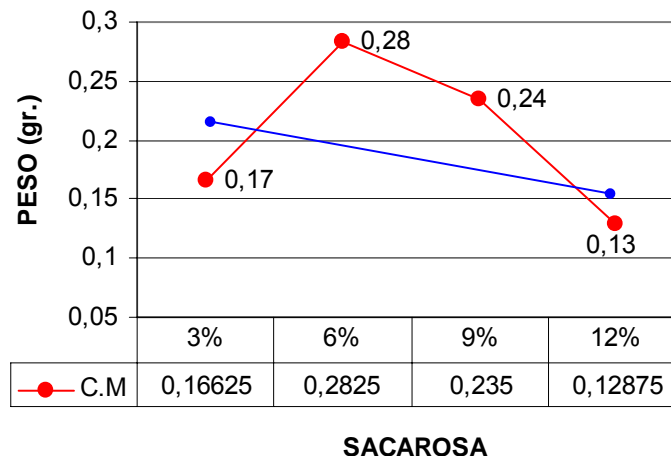


Figura 51. Variación del peso de microbulbillo para el ecotipo Colorado de Mendoza por efecto de las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%”.

El análisis de regresión lineal del cuadro 55 confirma que a medida que se aumenta la concentración de sacarosa (hasta el 6%) para el ecotipo Colorado de Mendoza el peso de microbulbillo aumenta, pasado esa concentración el peso disminuye considerablemente. El coeficiente de determinación “r²” indica que la variación en el peso de microbulbillo es consecuencia de las concentraciones de sacarosa en un 95%, el restante 5% se debe a las características fisiológicas propias de cada ecotipo así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe asociación negativa pasada el 6% de sacarosa. Se

puede esperar que a medida que se aumente la concentración de sacarosa pasado el 6%, el peso de microbulbillo disminuirá. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada mg de sacarosa suministrado al medio de bulbificación el peso de microbulbillo disminuirá en 0.005 gr.

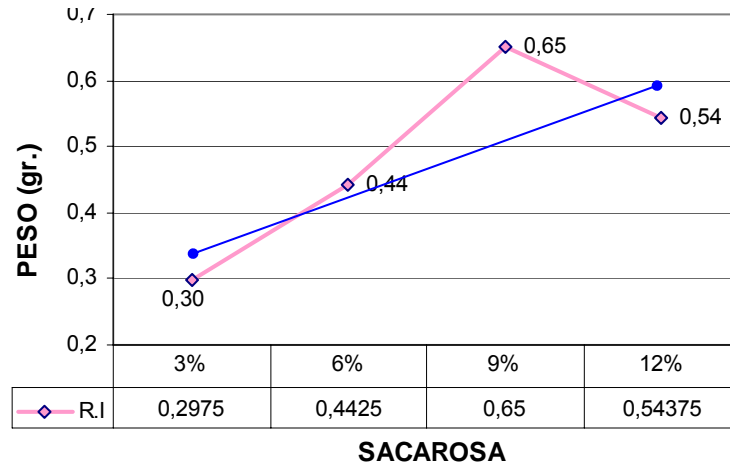


Figura 52. Variación del peso de microbulbillo del ecotipo Rosado de Italia por efecto de las concentraciones de sacarosa 3%,6%,9%,12%”.

De la misma manera se realizó el análisis de regresión lineal para el ecotipo Rosado de Italia, donde el peso de microbulbillo aumenta, hasta una concentración del 9% de sacarosa, pasado esa concentración el diámetro disminuye considerablemente. El coeficiente de determinación “ r^2 ” indica que el aumento en el peso es consecuencia del porcentaje de sacarosa en un 65%, el restante 35% se debe a otros factores como ser las características fisiológicas propias de cada ecotipo. Así mismo el coeficiente de correlación “r” indica que existe una asociación positiva entre las concentraciones de sacarosa y el aumento en el peso de microbulbillo. Se puede esperar que a medida que se aumente la concentración de sacarosa hasta el 9%, el diámetro de microbulbillo aumentará. El coeficiente de regresión “b” indica que por cada mg. de sacarosa suministrado al medio de bulbificación el peso de microbulbillo aumenta en 0.25 gr. Al respecto Gómez (2008), menciona que, las concentraciones de sacarosa son un factor determinante para producir una variación en el peso de microbulbillos, tal variación es producto de un aumento en el potencial osmótico en el medio de cultivo, asimismo, Darías (1993), indica que esta diferencia es también influenciada por las características genotípicas propias de cada ecotipo.

5.4 Análisis económico.

Para una mejor interpretación y comprensión del análisis realizado, se tomaron en cuenta los costos que varían por cada tratamiento en relación a los insumos (Anexo 8), en ellos se identificó la variación de un tratamiento a otro. La interpretación se realizó en primera instancia por etapas y posteriormente en forma individual.

Cuadro 56. Análisis de costos totales para la etapa de establecimiento.

Item	Establecimiento
Sales nutritivas Ms	1025.5
Insumos de laboratorio.	1307.5
Material vegetal	80
Otros	525
Total Bs.	2938
Total \$us.	391,73

En el cuadro 56 se detalla los costos totales para la etapa de establecimiento en función al medio basal “Ms” (Murashige & Skoog, 1962). El costo total al que haciende esta etapa es 391.73 \$us. En el cuadro 57 se muestra el análisis de costos individuales para cada explante introducido en la etapa de establecimiento, el costo total por cada vitroplanta asciende a 4.08 \$us tomando en cuenta la formulación del medio de cultivo “Ms”, los insumos utilizados, y el costo de mantenimiento de los equipos necesarios para realizar esta investigación.

Cuadro 57. Análisis de costos individuales para la etapa de establecimiento por cada explante.

Item	Establecimiento
Sales nutritivas	11.20
Insumos de laboratorio.	13.61
Material vegetal	0.33
Otros	5.46
Total Bs / vitroplanta.	30.6
Total \$us.	4.08

Para la etapa de multiplicación se tomaron en cuenta los costos variables por cada tratamiento en función a los insumos (Anexo 9), las principales variaciones fueron

producto del extracto de quinua suministrado a los diferentes medios y la formulación del medio de cultivo “MsM” con sales comerciales (SC).

Cuadro 58. Análisis de costos individuales para la etapa de multiplicación por cada vitroplanta.

Multiplicación				
Item	Tratamientos			
	Ms	MsM	MsM +EQ	Ms+EQ
Sales nutritivas	17,09	5,50	5,63	17,22
Vitroplantas	30,60	30,60	30,60	30,60
Extracto de quinua (EQ)	0	0	3.5	3.5
Otros	8,75	8,75	8,75	8,75
Total Bs / vitroplanta.	56,44	44,85	48.48	60.07
Total \$us.	7,53	5,98	6.46	8.01

En el cuadro 58 se aprecia el costo individual por tratamiento donde el medio de cultivo “MsM” demostró ser el medio más económico, alcanzando un valor de 5.98 \$us por cada vitroplanta, costo que refleja el bajo precio en su formulación. El “MsM” demostró también ser el medio más eficiente al momento de promover la formación de brotes adventicios, en comparación a los medios “MsM+EQ” , “Ms” y “Ms+EQ” que alcanzaron costos de producción de 6.46 \$us ; 7.53 \$us y 8.0 \$us respectivamente siendo el “Ms+EQ” el medio de cultivo más costoso para producir una vitroplanta.

Cuadro 59. Análisis de costos totales, individuales y relación beneficio / costo para la etapa de multiplicación.

Tratamientos		Costo total por tratamiento (\$us)	Costo individual (\$us)	Relación beneficio costo(B/C)
Factor A	Factor B			
Colorado de mendoza	Ms	376,3	7,53	1.06
	MsM	239,2	5,98	1.33
	MsM + EQ	258,5	6.46	1.23
	Ms + EQ	320,4	8.01	0.99
Rosado de Italia	Ms	376,3	7,53	1.06
	MsM	239,2	5,98	1.33
	MsM + EQ	258,5	6.46	1.23
	Ms + EQ	320,4	8.01	0.99

En el cuadro 59 se destaca el precio total por cada tratamiento, donde el “MsM” demuestra ser el medio de cultivo más rentable, promoviendo la mayor Relación “Beneficio/Costo” de 1.33 es decir que adicionalmente al 1 \$us invertido, se gana 0,33 \$us por cada vitroplanta elaborada. Considerando que el precio unitario por cada vitroplanta es comercializado en 8 \$us como promedio.

Sin embargo los resultados obtenidos con la utilización del medio “MsM” fueron todavía insuficientes para justificar la etapa de multiplicación, por tanto, en una simultanea investigación se utilizó como medio basal el “MsM” más la acción de Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L) donde el número de brotes por vitroplanta aumentó satisfactoriamente. Para esta investigación se evaluó los costos de producción de cada vitroplanta bajo el efecto de los reguladores de crecimiento Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L) presentando los siguientes resultados:

Cuadro 60. Análisis de costos individuales para la etapa de multiplicación bajo el efecto de reguladores de crecimiento Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L).

Tratamiento con “KIN + AIA”		
Costos fijos	MSM	44,85
Costos que varían	Kin (1mg/L)	12.12
	AIA (2 mg/L)	15.00
Costo Total MSM + KIN y AIA		71,97
Total \$us / vitroplanta.		9,60

En el cuadro 60, se observa que el costo de cada vitroplanta es de 9.60 \$us costo justificado por el satisfactorio resultado obtenido, puesto que, bajo el efecto de Kinetina (1mg/L) y AIA (2 mg/L) el número de brotes aumentó satisfactoriamente. Al respecto Gómez (2008), indica que formación de brotes es una de las etapas fundamentales en la micropropagación ya que no solamente permite obtener un alto número de clones homogéneos, sino que es una de las formas de bajar los costos de producción, al momento de inducir a una vitroplanta que forme dos brotes, el costo de producción individual se reduce a la mitad.

Cuadro 61. Análisis de costos totales, individuales y relación beneficio / costo para la etapa de bulbificación.

Tratamientos		Costo total por tratamiento (\$us)	Costo individual (\$us)	Relación beneficio costo(B/C)
Factor A	Factor B			
Colorado de Mendoza	3%	333.7	6.7	1.34
	6%	368.3	7.4	1.21
	9%	403.0	8.1	1.11
	12%	437.7	8.8	1.02
Rosado de Italia	3%	333.7	6.7	1.34
	6%	368.3	7.4	1.21
	9%	403.0	8.1	1.11
	12%	437.7	8.8	1.02

En el cuadro 61 se destaca el precio total por cada tratamiento para promover el proceso de bulbificación donde la concentración 3% de sacarosa obtiene el mayor “Beneficio / Costo” de 1.34 es decir que, adicionalmente al 1 \$us invertido, se gana 0,34 \$us por cada microbulbillo. Sin embargo los resultados indican que para el ecotipo Colorado de Mendoza la mejor concentración para promover el proceso de bulbificación es sacarosa al 6% teniendo un costo por tratamiento de 368.3 \$us y un costo individual de 7.4 \$us obteniendo un “Beneficio / Costo” de 1.21 es decir que adicionalmente al 1 \$us invertido, se gana 0,21 \$us por cada microbulbillo. En el ecotipo Rosado de Italia la mejor concentración para promover el proceso de bulbificación es sacarosa al 9% donde el precio total del tratamiento es de 403.0 \$us y un costo individual de 8.1 \$us obteniendo un “Beneficio / Costo” de 1.11 es decir que adicionalmente al 1 \$us invertido, se gana 0,11 \$us.

Cuadro 62. Análisis de costos individuales para la etapa de bulbificación bajo el efecto de las distintas concentraciones de sacarosa 3%, 6%, 9%, 12%.

Bulbificación				
ITEM	Tratamientos			
	3%	6%	9%	12%
Sacarosa.	5,2	10,4	15,6	20,8
Vitroplantas.	44,85	44,85	44,85	44,85
Total Bs / vitroplanta.	50,05	55,25	60,45	65,65
Total \$us.	6,7	7,4	8,1	8,8

En el cuadro 62 se muestra el costo final de cada microbulbillo obtenido en esta investigación, de acuerdo a los resultados alcanzados las concentraciones 9% y 6% fueron las más favorables para inducir el proceso de bulbificación, siendo sus costos de producción individual 8.1 \$us y 7.4 \$us respectivamente que se encuentran dentro del costo normal de comercialización de semilla pre-básica como se detalla a continuación en el cuadro 63.

Cuadro 63. Costos individuales y por kilogramo de semilla pre-básica obtenida por los diferentes laboratorios de cultivo de tejidos vegetales.

Producto	PROINPA		E.M.I		IBTEN			SEPA
	Papa	Izaño	Papa	Banano	Papa	Oca	Izaño	Papa
Costo Kg (\$us)	28	33	34	-	27	27	27	38
Costo individual (\$us)	7.86	8.25	8.5	9.7	6.75	6.75	6.75	9.5

Fuente: Recopilación propia, (2008).

En el cuadro 63 se muestran los diferentes precios que ofertan los distintos laboratorios de cultivo de tejidos, en el se detalla el costo unitario de cada vitroplanta, así como el costo por cada kilogramo de semilla pre-básica.

6. CONCLUSIONES.

- Para la etapa de establecimiento, el elevado porcentaje de supervivencia fue satisfactorio, atribuible a la eficiente manipulación de los explantes y al efectivo protocolo de desinfección utilizado.
- El 95.8 %, de los explantes del ecotipo Colorado de Mendoza y el 89.58 % de los explantes del ecotipo Rosado de Italia, fue libre de contaminación alguna, demostrando condiciones favorable para el cultivo de tejidos *in vitro*.
- El medio de cultivo “Ms” (Murashige, y Skoog) provee las condiciones más favorables para inducir la regeneración *in vitro* de los ecotipos Colorado de Mendoza y Rosado de Italia.
- En la etapa de multiplicación, la formación de brotes es un factor determinante, por lo tanto, el mejor medio de cultivo que contribuyó en la formación de brotes fue el “MsM” (Murashige, y Skoog Modificado con sales comerciales) alcanzando un promedio de 1.16 brotes por explante para el ecotipo Colorado de Mendoza y 1 brote por explante para el ecotipo Rosado de Italia.
- El medio de cultivo “MsM” suplementado con los reguladores de crecimiento Kinetina (1mg/L) y Ácido indolacético (2mg/L) mostraron una mayor regeneración de brotes adventicios, alcanzando un promedio de 2.1 brotes por explante para el ecotipo Colorado de Mendoza y 1 brotes por explante para el ecotipo Rosado de Italia.
- El ecotipo que responde de mejor manera al proceso de multiplicación es el Colorado de Mendoza puesto que en algunas repeticiones alcanzó a formar hasta tres brotes por vitroplanta.
- El análisis de regresión lineal indica que a medida que se suministra el extracto de quinua en el medio “MsM” el número de brotes disminuye en ambos ecotipos.

- A medida que se suministra extracto de quinua en los medios “Ms” y “MsM” el número de raíces disminuye considerablemente, hallazgo de suma importancia que reduce el riesgo de contaminación al momento del subcultivo.
- Para ambos ecotipos el número de raíces alcanzado es mínimo, factor que permitió la ágil manipulación del explante al momento de realizar el subcultivo.
- El ecotipo Rosado de Italia, alcanzó la mayor altura de planta 14.79 cm mientras que el ecotipo Colorado de Mendoza obtuvo una altura final de 10.44cm.
- Para la etapa de microbulbificación se determinó que la relación peso - diámetro de microbulbillo son las variables más representativas.
- La mejor concentración para promover el proceso de bulbificación es sacarosa al 6%, en el ecotipo Colorado de Mendoza y 9% de sacarosa en el ecotipo Rosado de Italia, pasado esa concentración el diámetro y peso de microbulbillo disminuye considerablemente.
- Finalmente, conforme a los resultados obtenidos se logró evaluar el comportamiento morfológico del explante en las etapas de establecimiento, multiplicación y microbulbificación *in vitro*, de igual manera se determinó el mejor medio nutritivo para promover el proceso de multiplicación. Se consiguió determinar la concentración adecuada de sacarosa para promover el proceso de microbulbificación. Además se logró evaluar la respuesta morfológica de los dos ecotipos de ajo, al proceso de microbulbificación.

7. RECOMENDACIONES.

Las recomendaciones para realizar trabajos relacionados a la presente investigación son los siguientes:

- En la etapa de establecimiento, continuar evaluaciones de los meristemos por más de 42 días, utilizando el medio basal “Ms” (Murashige & Skoog, 1962) con sacarosa al 3% sin la adición de reguladores de crecimiento.
- Realizar estudios sobre la siembra de meristemos en medio de cultivo líquido, para obtener vitroplantas rejuvenecidas.
- Realizar estudios sobre la utilización del medio basal “MsM” (Murashige, y Skoog Modificado con sales comerciales) suplementado con los reguladores de crecimiento Kinetina (1mg/L) y Ácido indolacético (2mg/L), en distintas especies.
- Realizar trabajos de investigación en vitroplantas de ajo con mayores concentraciones de Kinetina (mayor a 1mg/L) y Ácido indolacético (mayor a 2mg/L), a fin de obtener el mayor número de brotes posible.
- Realizar pruebas y ensayos en distintas especies con diversas concentraciones de extracto de quinua a fin de reducir el número de raíces en la etapa de micropropagación.
- Realizar trabajos de investigación en el medio basal “MsM” incrementando las concentraciones de sacarosa, por encima de los 60gr/L, en medio de cultivo líquido, a fin de obtener una vigorosa microbulbificación.
- Realizar trabajos de investigación concernientes a la obtención de metabolitos primarios (alliína “sulfóxido de S-alil-cisteína”) a partir del cultivo de meristemos, provenientes de microbulbillos.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- ALVARADO, L., J. Basail, J. Bonel, J. Brasesco, A. Codromaz de Rojas, A. Conde, A. Coscia, E. Dagoberto. 1998. El cultivo del maíz. INTA. 88-102.
- ARGUELLO, O; MEJIA, L. 2000. Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción. CORPOICA (Corporación Colombiana de Agricultura y Ganadería) Bucaramanga, CO. 144p.
- BHOJWANI S.S. 1980. *In vitro propagation* of garlic by shoot proliferation. En *Scientia horticulturae*. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam, Holanda. 47 – 52pp.
- BONGA, J. M. and DURZAN, J. 1987. Cell and Tissue Culture in Forestry. General Principles and Biotechnology. 3 Vols.
- BURBA, J. L. 1992. Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum* L.). En: producción, poscosecha, procesamiento, y comercialización del ajo, cebolla y tomate. Santiago de Chile: FAO.
- CABRERA, CARMEN Y P. ELLIOT. 1996 La cabeza que sólo tiene dientes. Primer encuentro sobre agricultura urbana y su impacto. Pp. 22.
- CONCI, V.,D.N. MORICONI y S.F. NOME. 1986. Cultivo de meristemas apicales de seis tipos clonales de ajo (*Allium sativum* L.). En :Phyton.Berkeley, Estados Unidos. 187 – 194 pp.
- CONCI, V.C. 1997. Virus y fitoplasmas de ajo. En Burba, J. L. 50 temas sobre producción de ajo. Vol. 3, pp. 267-291. EEA-INTA
- CUBA. MINAG, 1983; Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Ciudad de La Habana, Cuba, MINAG. 26 p.
- DARIAS, R. 1993. Recopilación de temas sobre técnicas de cultivo in vitro. Oruro, Bolivia. U.T.O. Universidad Camilo Cienfuegos de Matanzas. Cuba. 169 p.
- DIXON, 1994 "Evidence-based Trade Policy Decision Making in Australia and the development of Computable General Equilibrium Modelling," Centre of Policy Studies/IMPACT Centre.

- ECOLOGY AND EVOLUTIONARY BRIEF. 1999. In our Department we perform multidisciplinary research (evolutionary ecology, behavioral ecology, spatial population ecology, interactions, demography and population dynamics, extinction patterns)
- ECHENIQUE, V., RUBINSTEIN, C. y MROGINSKI, L. 1998. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte VIII, Cap. 5: 303-312. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina. ISBN 987-521-138-9.
- FAO. 1991. Manual de intercambio y propagación de germoplasma de ajo a través de microbulbillos. Facultad de ciencias agropecuarias. Argentina. 45 p.
- GIULETTI, A. 1998. Producción de Metabolitos Secundarios a partir de cultivos *in vitro* de *Allium sativum* L. de interés en la Industria Farmacéutica y Alimentaria.
- GIACONI, M. y ESCAFF, M. 1993. Cultivo de hortalizas. Santiago de Chile, Editorial Universitaria. 332p.
- GÓMEZ, E. 2002. Fundamentos físico químicos relacionados con el cultivo de tejidos *in vitro*. 21p
- GUENKO, G. 1983 Fundamentos de la horticultura cubana. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. pp. 106.
- HARTMANN H. T. y KESTER D. E. 1995. Plant propagation principles and practices. 2nd ed. Prentice Hall Englewood Cliffs, N. J. 598 p. 1974. New frontiers in plant propagation. Plant. Prop. Soc. 24:178-185.
- HURTADO D.V y MERINO M.E. 1997. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial trillas. México, D.F. 232p.
- HUERRES y CARABALLO, 1991 Horticultura. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 193 pp. Huerres, Consuelo y Nelia Carballo. 1996. Horticultura. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 193 pp.
- INE 2000. Datos del INE /MSPS /OPS, Suministro de Energía Alimentaria, requerimiento SEA adecuado esperado, para centros urbanos en valles, para centros urbanos en altiplano, y para centros urbanos en llanos.

- JIMÉNEZ, E. 1999. Aplicaciones de la biotecnología en la mejora genética de plantas y en la producción de semillas. Modulo 4. Propagación Masiva de Plantas in vitro. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 82 p.
- KITTO, 1997. "Codes, Involutions and DNA Encodings," University of Western Ontario, London, Ontario, Canada. Submitted. <http://citeseer.ist.psu.edu/447594.html>
- MACIA, 2003 Ministerio de Asuntos Campesinos, Indígenas y Agropecuarios. Cadenas productivas de l Ajo (*Allium sativum* L.).
- MARTÍNEZ D. L. 1995. Aguilera, R; Osorio, D; Fernández, N. Resultados de la explotación de las casas de cultivos tipo sombrilla en Jiquima, Holguin. Ciudad de la Habana.
- MALDONADO, F 2005. Apuntes de cátedra Botánica General. Facultad de agronomía - UMSA. La Paz - Bolivia.
- MENDOZA, V 2006. Apuntes de cátedra Biotecnología vegetal. Facultad de agronomía UMSA. La Paz - Bolivia.
- MEDINA, A. 1990. Manejo fisiotécnico del bulbo y bulbillos del ajo (*Allium sativum* L.). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Facultad de Ciencias biológicas y agropecuarias. Arequipa, Perú.
- MEJÍA, R. 1988. Cultivo *in vitro* de plantas de papa. Manual de laboratorio. Programa de investigación en papa Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial. Año 1/No 1, Perú. 110 p.
- MURASHIGE, T. Y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- MELLADO, Z. M. 2004. Curso internacional en mejoramiento y mantenimiento de variedades. Modulo 1. PROGRAMA NACIONAL DE SEMILLAS (PNS). BOLIVIA. Cochabamba, Bolivia. pp 36.
- MENDEZ, J. 1995. Informe final; comercialización y mercadeo de ajo. Programa de asistencia técnica VOCA/BOLIVIA. Cochabamba, Bolivia, pp.19
- MORICONI, D.N., V.C.CONCI and S.F.NOME. 1990. Rapid Multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 51 (2): 145-151. ISSN: 0031-9457.

- MARGARA, J. 1988. multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro* ; Los meristemas y la Organogénesis. Trad. Por J. M. Matero Box y P. Urbano Terrón. Ed. Mundiprensa. Madrid, España. 232 p.
- MENDIOLA, L. 2003. Cienciorama El ajo (*Allium sativum* L.) y el ajo de oso (*Allium ursinum*).
- MOHAMED -YASSEEN .1995. Explants from young joints of mature plants of tuna (*Opuntia ficus-indica* Mill.) were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing 8.8 M benzyladenine (BA) and 0.5 M naphthaleneacetic acid.
- MROGINSKI, 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, CO. 1991. p. 825-855.
- NÚÑEZ, 1996. A novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, The University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA.
- OLMOS, S. y ERNESTINA. 1998. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. 45p.
- ORELLANA, 1998 Orellana, P. 1998. Propagación vía organogénesis. p. 151-178. En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- PATENA, L. 1998. Biotechnology of Perennial Fruit Crops (eds Hammerschlag, F. A. and CAB International, Wallingford, UK, 1992, pp. 3-34.
- PERRIN. 1988. La formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos. CIMMYT. 79 pp.

- PÉREZ ,1998 Pérez, J., E. Jiménez y D. Agramante. 1998. Propagación vía organogénesis. p. 179-190. En: Pérez J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. 1era edición. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba.
- PIERIK R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundiprensa Madrid, España. 326 p.
- PRODIZAVAT (Programa de Desarrollo Integral, en la Zona Andina y el Valle alto de Tarija. en las provincias Méndez y Cercado. Tupiza Potosí (Bolivia). UATF. 2000. 51 p.
- QUEZADA, L. A. 1999. Evaluación del potencial de regeneración de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) en el proceso de microbulbificación *in vitro*. Tesis de grado para optar a título de ingeniero agrónomo. EMI. La Paz, Bolivia. pp 2.
- RACCA R. W. 1989 La microbulbificación en ajos de sanidad controlada. En primer curso taller / sobre Producción Comercialización e industrialización de ajo. Mendoza, Argentina
- RAVNIKA, 1993. Jasmonic acid stimulates Shoot and bulk formation of Garlik *in vitro*. En journal of plant growth regulation. 12: 73 - 77
- ROCA W. y L. MROGINSKI. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. pp 36.
- ROSELL, C.H. y VILLALOBOS, V.M. 1990. Fundamentos teórico prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). Roma, Italia. 112 p.
- RODRIGUEZ, M 2000. Morfología y anatomía vegetal. Tercera edición. Cochabamba Bolivia. 511p.
- RODRIGUEZ, M y VILLARROEL, J 1998. Manual de Prácticas de laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal. Cochabamba – Bolivia. 166p.
- SMITH, 1992 biosíntesis, fotosíntesis, compuestos orgánicos, hidratos de carbono. Buenos Aires: addison-wesley iberoamericana, 1998· glosario p. 220 · índice de materias p. 222

- SMITH, M. y L. SPOOMER. 1995. Vessels, gels, liquid media and support systems. p. 145-163. En: J. Aitken-Christie, T. Kozai, M.A.L. Smith (Eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Academic Publishers, Dordrecht.
- STAHLSCHMIDT, 1991 Manejo de la dormición, brotación en bulbos de ajo .Agro de Cuyo, Jornadas. Allium sativum; Fisiología vegetal; Latencia; Brotación.
- SERRANO, 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 Manual Serrano Gregory J. Hannon & David Beach Nature 366, 704 - 707 (1993).
- TERÁN, ALCAZAR, F. 1997. Propagación de tres especies de atriplex mediante cultivo de tejidos *in vitro* por organogenesis. Tesis. Ing. Agronómica. Escuela Militar de Ingeniería "Mcal. Antonio Jose de Sucre". La Paz, Bolivia.
- TERRÓN, 1988 Sensory ecology. How organisms acquire and respond to information. New York. W. H. Freeman. 1992. xx, 558 p. Incluye bibliografía e índice Sentidos. Homeóstasis. Balance fisiológico. Respuesta a estímulos. Fisiología comparada. Ecología
- VICENTE, R. J. 2001. Guía metodológica de diseños experimentales. Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Agronomía. La Paz , Bolivia pp 175.
- VIGLIOLA, M. T. 1986. Manual de horticultura. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina pp. 96.
- VAVILOV, N.I. (1951). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. Start. *Chron. Bot.* 13: 1-366.
- VALADEZ, A. (1993). Producción de hortalizas. Editorial LIMUSA: México. 292 pp.
- VILLAROEL. L.D.; DE LA BARRA J. E. 19994. Plagas y enfermedades del ajo. Centro de Asesoramiento en Desarrollo Integral Agropecuario. Cochabamba, Bolivia.
- WIKIPEDIA, 2007 la enciclopedia libre [en línea]:[fecha de consulta 27 Abril de 2007] PHP En - Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/PHP>

A N E X O S

ANEXOS.

ANEXO 1. Sales orgánicas del medio basal Murashige & Skoog (1962). MS.

REACTIVOS	FORMULA	CANTIDAD
MACRONUTRIENTES		
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900 (mg/l)
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1650 (mg/l)
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	440 (mg/l)
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370 (mg/l)
Fosfato Monopotásico	KH ₂ PO ₄	170 (mg/l)
MÍCRONUTRIENTES		
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,30 (mg/l)
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60 (mg/l)
Acido Bórico	H ₃ BO ₃	6,20 (mg/l)
Ioduro de Potasio	KI	0,83 (mg/l)
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025 (mg/l)
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 (mg/l)
Cloruro de Cobalto	CoCl 6H ₂ O	0,025 (mg/l)
HIERRO		
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,81 (mg/l)
EDTA Di sódico	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,31 (mg/l)
VITAMINAS		
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,00 (mg/l)
Thiamina	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₅ .HCl	0,40 (mg/l)
Acido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,50 (mg/l)
Piridoxina HC1	C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl	0,50 (mg/l)
AMINOÁCIDOS		
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₃	2,00 (mg/l)
ADITIVOS		
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,0 (g/l)
Agar		6,5 (g/l)

Fuente: IBTEN (2007)

ANEXO 2. Sales orgánicas del medio basal Murashige & Skoog Modificado.

** Con sales comerciales "MsM".

REACTIVOS	FORMULA	CANTIDAD
MACRONUTRIENTES		
** Nitrato de Potasio	KNO ₃	1900 (mg/l)
** Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1650 (mg/l)
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	440 (mg/l)
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ 7H ₂ O	370 (mg/l)
Fosfato Monopotásico	KH ₂ PO ₄	170 (mg/l)
MÍCRONUTRIENTES		
** Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	3700 (mg/l)
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60 (mg/l)
Acido Bórico	H ₃ BO ₃	6,20 (mg/l)
Ioduro de Potasio	Ki	0,83 (mg/l)
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,025 (mg/l)
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 (mg/l)
Cloruro de Cobalto	CoCl 6H ₂ O	0,025 (mg/l)
HIERRO		
Sulfato Ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,81 (mg/l)
EDTA Di sódico	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,31 (mg/l)
VITAMINAS		
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100,00 (mg/l)
Thiamina	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ O ₅ .HCl	0,40 (mg/l)
Acido Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,50 (mg/l)
Piridoxina HC1	C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl	0,50 (mg/l)
AMINOÁCIDOS		
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₃	2,00 (mg/l)
ADITIVOS		
Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30,0 (g/l)
Agar		6,5 (g/l)

Fuente: IBTEN (2007)

ANEXO 3. Medios de multiplicación.

b 1 = MS. Murashige & Skoog (1962). Medio para 200 ml.

REACTIVO	SOLUCIÓN	Unidad
Macro y micro nutrientes.	“ A ”	10 ml
	“ B ” “ C ” “ D ”	5 ml
	“ E “	1 ml
Vitaminas.	“ E “	1 ml
Acido giberélico.	AG ₃	1 ml
Sacarosa.		6 g.
Agar.		1.4 g.

Fuente: IBTEN (2007)

b 2 = MSM. Murashige & Skoog Modificado. Medio para 200 ml.

REACTIVO	Sub unidad	SOLUCIÓN	Unidad
Nitrato de Potasio.(KNO ₃) Nitrato de Amonio.(NH ₄ NO ₃) Macro y micro nutrientes	2.5 ml	“ A ”	10 ml
	2.5 ml.		
	5 ml.		
Sulfato de magnesio(MgSO ₄)	2.5 ml.	“ B “	5 ml
Macro y micro nutrientes	2.5 ml.	“ C ” “ D ”	
Vitaminas.	1 ml	“ E “	1 ml
Acido giberélico.	1 ml	AG ₃	1 ml
Sacarosa.	6 g.	-	6 g.
Agar.	1.4 g.	-	1.4 g.

Fuente: IBTEN (2007)

b 3 = MSM + EQ. Murashige & Skoog Modificado mas extracto de quinua.**Medio para 200 ml.**

REACTIVO	Sub unidad	SOLUCIÓN	Unidad
Nitrate de Potasio.(KNO ₃) Nitrate de Amonio.(NH ₄ NO ₃) Macro y micro nutrientes	2.5 ml	" A "	10 ml
	2.5 ml.		
	5 ml.		
Sulfato de magnesio(MgSO ₄)	2.5 ml.	" B "	5 ml
Macro y micro nutrientes	2.5 ml.	" C " " D "	
Vitaminas.	1 ml	" E "	1 ml
Acido giberélico.	1 ml	AG ₃	1 ml
Extracto de quinua	10 g.	-	10 g.
Sacarosa.	6 g.	-	6 g.
Agar.	1.4 g.	-	1.4 g.

Fuente: IBTEN (2007)

b 4 = MS + EQ. Murashige & Skoog (1962) más extracto de quinua.**Medio para 200 ml.**

REACTIVO	SOLUCIÓN	Unidad
Macro y micro nutrientes.	" A "	10 ml
	" B "	5 ml
	" C "	
	" D "	
Vitaminas.	" E "	1 ml
Acido giberélico.	AG ₃	1 ml
Extracto de quinua	-	10 g.
Sacarosa.	-	6 g.
Agar.	-	1.4 g.

Fuente: IBTEN (2007)

ANEXO 4. Medios de bulbificación.

MSM. Murashige & Skoog Modificado. Medio para 200 ml.

REACTIVO	Sub unidad	SOLUCIÓN	Unidad
Nitrato de Potasio.(KNO ₃) Nitrato de Amonio.(NH ₄ NO ₃) Macro y micro nutrientes	2.5 ml	“ A ”	10 ml
	2.5 ml.		
	5 ml.		
Sulfato de magnesio(MgSO ₄)	2.5 ml.	“ B “	5 ml
Macro y micro nutrientes	2.5 ml.	“ C ” “ D ”	
Vitaminas.	1 ml	“ E “	1 ml
Acido giberélico.	1 ml	AG ₃	1 ml
	Tratamiento.	Concentración	Unidad
Sacarosa.	b1	3 %	6 g/L
	b2	6 %	12 g/L
	b3	9 %	18 g/L
	b4	12 %	24 g/L
Agar.	1.4 g.	-	1.4 g.

Fuente: IBTEN (2007)

ANEXO 5. Detalla características particulares de equipos a utilizar en el Laboratorio de Biotecnología vegetal.

Equipo.	Característica.
•Auto Clave.	Aparato que se utilizó para esterilizar objetos y sustancias situados en su interior, por medio de vapor y altas temperaturas a 121 °C , 1 atmósfera de sobre presión, durante 15 – 20 minutos.
•Balanza Analítica.	Se utilizó para pesar propiamente los reactivos y posteriormente los microbulbillos.
•Cámara de Flujo laminar.	Aparato destinado a evitar la contaminación proporcionando un ambiente completamente aséptico.
•Destilador de Agua	Proporcionará agua pura separando moléculas inorgánicas por medio del calor (Cl ⁻ , Fe ⁻ , Na), para elaborara los medios de cultivo.
•H. Microondas.	Se utilizó únicamente para diluir el Agar en el medio de cultivo
•Potenciómetro pH.	Se utilizó para ajustar el medio de cultivo a pH = 5.7
•Cámara germinadora.	Se utilizó para romper el estado de dormancia del material vegetal.

ANEXO 6. Características particulares de materiales de vidrio a utilizar en la elaboración de medios de cultivo.

MATERIAL.	CARACTERÍSTICA.
• Matraces Erlenmeyer de (100,200,500 ml).	Recipiente de forma troncocónica que se utilizó en el laboratorio para medir o contener líquidos.
• Pipetas graduadas de (10,20,25 ml).	Instrumentos que se utilizó para medir o transvasar pequeñas cantidades de líquido.
• Probetas Graduadas de (100,500 ml.).	Tubo de cristal, destinado a contener líquidos y medir su volúmen.
• Tubos de ensayo.	Destinado a contener pequeñas cantidades de medios de cultivo.
• Vasos de precipitados.	Material destinado a contener y medir líquidos.

ANEXO 7. Detalla el material de asepsia.

GERMICIDA	CARACTERÍSTICA.
• Alcohol a 70%	Elimina la proliferación de microorganismos.
• Detergente	Su carga ionizante permite limpiar un objeto sin corroerlo.
• Hipoclorito de sodio 8%	Elimina la proliferación de microorganismos. (hongos, bacterias, esporas)
• Jabón germicida	Permite eliminar gérmenes en las manos.

ANEXO 8. Análisis de costos variables y totales por vitroplanta.

ITEM	ESTABLECIMIENTO			
Sales nutritivas	17,09			
Insumos de laboratorio.	21,79			
Material vegetal	0,33			
Otros	8,75			
Total Bs / vitroplanta.	47,97			
	MULTIPLICACIÓN			
ITEM	Tratamientos			
	Ms	MsM	MsM +EQ	Ms+EQ
Sales nutritivas	17,09	5,50	5,63	17,22
Vitroplantas	47,97	47,97	47,97	47,97
Otros	8,75	8,75	8,75	8,75
Total Bs / vitroplanta.	73,81	62,22	62,34	73,93
	BULBIFICACIÓN			
ITEM	Tratamientos			
	3%	6%	9%	12%
Sacarosa	3,2	6,4	9,6	12,8
Vitroplantas	62,22	62,22	62,22	62,22
Total Bs / vitroplanta.	65,42	68,62	71,82	75,02
TOTAL\$us / vitroplanta.	8,7	9,1	9,6	10,0

ANEXO 9. Presupuesto

ITEM	CANTIDAD	UNIDAD	PRECIO UNITARIO (Bs.)	PRECIO TOTAL
Material de laboratorio e insumos				
1. Sales nutritivas de MS	10	Sobre	50	500
2. Nitrato de Amonio	1	Kg.	50	50
3. Nitrato de Potasio	1	Kg.	50	50
4. Sulfato de Magnesio	1	Kg.	50	50
5. Agar	¼	Kg.	1770	1770
6. Sacarosa	4	Kg.	460	1840
7. Alcohol	4	Lata.	130	520
8. Hipoclorito de sodio	8	Litro	7	56
9. Papel Aluminio.	4	Rollo.	25	100
10. Plastifilm.	4	Rollo.	25	100
11. Algodón.	5	Kg.	45	225
12. Bisturí	50	Hojas.	4	200
Material vegetal de estudio				
Bulbos de Ajo ecotipo Rosado De Italia.	2	Kg.	20	40
Bulbos de Ajo ecotipo Colorado De Mendoza.	2	Kg.	20	40
Gastos de envió de material vegetal				
1. Embalaje.	1	Caja	15	15
2. Gasto por envió	1	Encomienda	35	35
Material de gabinete				
1. Material de escritorio.	-	-	-	1000
2. Tinta para impresiones.	3	Unidad	100	300
3. Documento final.	8	Ejemplares.	400	3200
Otros				
1. Pasajes al Instituto.	7	Mes	150	1050
2. Alimentación.	7	Mes	300	2100
3. Energía eléctrica – agua.	7	Mes	300	2100

Presupuesto general

ITEM GENERAL	Bs.
Material de laboratorio e insumos	5461
Material vegetal de estudio	80
Gastos de envió de material vegetal	50
Material de gabinete	4500
Otros	5250
TOTAL + IMPREVISTOS (15%)	17642.15