



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

## **Micropropagación de genotipos sobresalientes de ajo (*Allium sativum* L.)**

**EUCARIO MANCILLA ÁLVAREZ**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2016

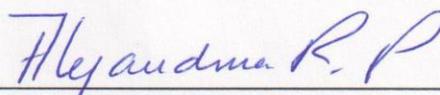
La presente tesis titulada: Micropropagación de genotipos sobresalientes de ajo (*Allium sativum* L.) realizada por el alumno: Eucario Mancilla Álvarez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR



DRA. MA. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR



DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2016

# MICROPROPAGACIÓN DE GENOTIPOS SOBRESALIENTES DE AJO (*Allium sativum* L.)

Eucario Mancilla Álvarez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta que se emplea en gran parte del mundo como condimento y por sus propiedades medicinales, se reproduce exclusivamente en forma vegetativa, proceso que da como resultado un bajo coeficiente de multiplicación y la transmisión de enfermedades. La micropropagación puede ser una herramienta para obtener propágulos de calidad en grandes cantidades y para la aplicación de la ingeniería genética en el mejoramiento genético de esta especie. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba), ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-bencilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina (cinetina), sorbitol, así como de las sales nutritivas en la respuesta morfogénica de cinco variedades de ajo. Puntas de raíz de tres días de edad de las variedades CEZAC, Barretero, Sainero, Cor P4 y Jas P4 se cultivaron en medios que contenían las sales de Murashige y Skoog (MS) o Chu *et al.* (N6), además de distintas concentraciones y combinaciones de dicamba, 2,4-D, cinetina, BAP. Asimismo, se probó el tiempo de exposición a sorbitol (0, 5 y 10 días). La combinación de dicamba o de 2,4-D con BAP (1.0 mg L<sup>-1</sup> y 0.5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) con las sales MS o N6, en el medio de inducción, indujo la formación de brotes adventicios anormales, masas compactas de células con clorofila, raíces, y brotes adventicios vitrificados. El sorbitol tuvo un efecto negativo en la formación de brotes adventicios. Las variedades CEZAC, Cor P4 y Jas P4 mostraron los valores más altos en cuanto al porcentaje de explantes que formaron callo organogénico. Los explantes cultivados en una combinación de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 2,4-D mg L<sup>-1</sup> o 1.0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 2,4-D mg L<sup>-1</sup>, formaron callo organogénico con la misma eficiencia (100 %). El número más alto de brotes por explante (19 a 24) se observó en las variedades CEZAC, Cor P4 y Jas P4. No se encontraron diferencias significativas para el número de brotes por explante, entre los medios que contenían 0.5 o 1.0 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 2,4-D. Las plantas se desarrollaron normalmente en invernadero, mostrando más del 80% de sobrevivencia.

**Palabras clave:** *Allium sativum* L., regeneración de plantas, cultivo de tejidos, organogénesis, callo, reguladores de crecimiento.

# **MICROPROPAGATION OF OUTSTANDING GENOTYPES OF GARLIC (*Allium sativum* L.)**

**Eucario Mancilla Álvarez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2016**

## **ABSTRACT**

Garlic (*Allium sativum* L.) is a plant that is used worldwide as a condiment and for its medicinal properties. This species reproduces exclusively vegetatively, which results in a low coefficient of multiplication and disease transmission. Micropropagation can be a tool to obtain quality propagules in large quantities and for the application of genetic engineering in the genetic improvement of this species. The aim of this work was to study the effect of 3, 6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba), 2, 4-D dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), 6-benzylaminopurine (BAP), 6-furfurylaminopurine (kinetin), sorbitol and nutrient salts on morphogenetic response of five varieties of garlic. Three days old root tips of CEZAC, Barretero, Sainero, Cor P4 and Jas P4 varieties were grown on media containing salts of Murashige and Skoog (MS) or Chu et al. (N6) plus different concentrations and combinations of dicamba, 2,4-D, kinetin, BAP. Also, the time of exposure to sorbitol (0, 5 and 10 days) was tested. The combination of dicamba or 2, 4-D with BAP (1.0 mg L<sup>-1</sup> and 0.5 mg L<sup>-1</sup>, respectively) and MS or N6 salts in the induction medium, promoted formation of abnormal adventitious shoots, compact masses of cells with chlorophyll, roots, and vitrified adventitious buds. Sorbitol had a negative effect on the formation of adventitious buds. CEZAC, Cor P4 and P4 Jas varieties showed the highest values for the percentage of explants that formed organogenic calli. Explants grown on a combination of 0.5 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 2, 4-D or 1.0 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 2, 4-D formed organogenic calli with the same efficiency (100%). The highest number of shoots per explant (19-24) was observed in CEZAC, Cor P4 and P4 Jas varieties. No significant differences in the number of shoots per explant were observed when these were cultured on media containing 0.5 or 1.0 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 2, 4-D. Regenerated plants grew normally in the greenhouse, showing more than 80% survival.

Keywords: *Allium sativum* L., plant regeneration, tissue culture, organogenesis, callus, growth regulators.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la oportunidad de vivir esta maravillosa experiencia de vida ya que adquiriré herramientas necesarias para mi formación no sólo profesional sino como persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por proporcionarme los medios económicos necesarios para realizar los estudios de maestría.

Con gran orgullo al Colegio de Postgraduados por brindarme la oportunidad de formar parte de su privilegiada comunidad estudiantil y su noble historia como institución.

A mi consejera Dra. Alejandrina Robledo Paz, por su apoyo, tiempo e infinita paciencia, durante todos estos años de formación académica, y compartir sus conocimientos, sus sabios consejos se quedan en mi mente y en mi corazón, su amistad es uno de los tantos tesoros que me regaló el Colegio de Postgraduados, sólo me resta decirle ¡Muchas gracias Doctora!

A la Dra. M. Alejandra Gutiérrez Espinosa, por su apoyo infinito para la realización de la tesis, porque siempre hubo un gesto amable y una brillante sonrisa cuando la necesité, sus infinitas palabras de aliento me daban ánimos para alcanzar pronto la meta.

Al Dr. J Oscar Mascorro Gallardo, por su valioso tiempo y dedicación para revisar la tesis y por la ayuda incondicional que siempre me brindó cuando lo necesité, también agradezco todas sus valiosas narraciones de experiencias profesionales que compartió conmigo, valoro mucho haberlo conocido.

A mis amigos y compañeros: por su amistad y palabras de aliento en momentos difíciles por su ayuda incondicional, tiempo, constancia, cariño que me brindaron a lo largo de estos maravillosos años de formación, siempre los llevaré en mi corazón. Cesar (Tucuch) Haas, Alfonso, Faustino, Azarel, por su tiempo, dedicación y amistad que me brindó durante todos estos años de maestría, a los (Gemelos) Manolo y Jesús, Juan (Juanbee), Flores, Salvador (Chava), Netly (La valiente), Viridiana, Victoria, María, Fátima, Irma (Chapis), Anna (Anastacia) por las grandes y maravillosas choco-aventuras que se quedaron en el recuerdo, y sobre todo por las maravillosas palabras postuladas por el “Bien me lo decía mi abuelo”, a todos mis amigos del Real Genética por la confianza depositada en mi persona y por tantas risas que hicieron que los días fueran divertidos siempre.

## DEDICATORIA

A mi novia

Con todo mi amor y cariño a mi compañera inseparable, Aidee Hernández Rivera, por formar parte en esta travesía del conocimiento y que sin percatarse, ha caminado a mi lado en los senderos de la ciencia y de la investigación, compartiendo conmigo los momentos más importante en este del conocimiento.

A mi Mamá: Reynalda Álvarez Gómez y Papá: Eucario Mancilla Díaz

Son lo único verdadero e incondicional que tengo en la vida; gracias porque creyeron en mí en todo momento, apoyaron todas mis locuras y ocurrencias que he tenido a lo largo de mi existencia; con todo mi amor y esfuerzo les regalo esta nueva meta, no olviden nunca que los amo con todo mi corazón.

A mi familia

Ustedes son mis cimientos como persona, han sido el más puro ejemplo de amor en mi vida, quiero que sepan que mi amor por ustedes es infinito como las estrellas y sé que cuando pase el tiempo y ustedes ya no estén, solo levantaré la mirada al cielo y buscare los luceros más brillantes sobre mí y ahí estarán siempre juntos resguardando mis pasos. Mis hermanos: Claudia Patricia, Josefa, Fausto, Matilde del Carmen y Julio Cesar, por estar apoyándome moralmente y dándome aliento en cada momento, Primos: Rigoberto y Apolinar (MOPRI), agradezco con todo mi corazón que se hayan puesto en mi camino, son mis maestros en muchos aspectos; los admiro y respeto, a Patricia y sobre todo al sobrino más travieso Yeray. A mis primos y amigos del rancho (Jhomenaz) que de una u otra manera aportaron su granito de arena, Abraham, Adela, Luisa, Ángel, en especial en Arbey (MEKO), Migel, y José Mario (CHELY) que con ellos la vida me deja claro que nada es casualidad, que vivimos juntos muchas aventuras desde niños; y aventuras que nos faltan por vivir. A todos aquellos amigos y miembros de mi familia que creyeron en mí.

## CONTENIDO

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN.....  | iii |
| ABSTRACT.....   | iii |
| AGRADECIMIENTOS.....  | v   |
| DEDICATORIA.....  | vi  |
| LISTA DE FIGURAS.....   | ix  |
| LISTA DE CUADROS.....   | xi  |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 1   |
| II. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....                                    | 3   |
| 2.1 Objetivo general.....   | 3   |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                    | 3   |
| 2.3 Hipótesis general.....  | 3   |
| 2.4 Hipótesis específicas.....                                    | 3   |
| III. REVISIÓN DE LITERATURA.....                                  | 4   |
| 3.1 Origen e historia del cultivo del ajo.....                    | 4   |
| 3.2. Descripción taxonómica.....                                  | 4   |
| 3.3. Descripción botánica.....                                    | 5   |
| 3.4. Variedades.....  | 8   |
| 3.4.1 Variedad Barretero.....                                     | 9   |
| 3.4.2 Variedad CEZAC 06.....                                      | 11  |
| 3.4.3 Variedad Cor P4 (Platero).....                              | 12  |
| 3.4.4 Variedad Jas P4.....  | 14  |
| 3.4.5 Variedad Sainero.....                                       | 14  |
| 3.5 Mejoramiento Genético.....                                    | 14  |
| 3.5.1 Selección clonal.....                                       | 14  |
| 3.5.2 Selección clonal masal.....                                 | 14  |
| 3.5.3 Selección clonal individual.....                            | 15  |
| 3.5.4 Mutagénesis.....  | 15  |
| 3.5.5 Variación somaclonal.....                                   | 16  |
| 3.5.6 Transformación genética.....                                | 17  |
| 3.6 IMPORTANCIA (usos).....                                       | 20  |
| 3.7 Principales países productores y exportadores.....            | 21  |
| 3.8 Situación del cultivo del ajo en México.....                  | 22  |
| 3.9 Estados productores de ajo en México.....                     | 23  |
| 3.10 Plagas y enfermedades del ajo.....                           | 24  |
| 3.10.1 Pudrición blanca.....                                      | 24  |
| 3.11 Obtención y manejo de semillas.....                          | 25  |
| 3.11.1 Propagación.....   | 26  |
| 3.11.2 Propagación por cultivo de tejidos (micropropagación)..... | 26  |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.11.2.1 Micropropagación .....   | 26        |
| 3.11.2.2 Embriogénesis somática .....   | 26        |
| 3.11.2.3 Organogénesis .....  | 27        |
| 3.11.2.4 Micropropagación de ajo .....  | 28        |
| <b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>30</b> |
| 4.1. Material vegetal .....   | 30        |
| 4.2 Desinfestación .....  | 30        |
| 4.2 Ensayo .....  | 31        |
| 4.2.1 Inducción de los callos morfogénéticos .....                                | 31        |
| 4.2.2. Regeneración de plantas .....  | 32        |
| 4.3 Experimento 1 .....   | 33        |
| 4.3.1 Inducción de los callos morfogénéticos .....                                | 33        |
| 4.3.2 Regeneración de plantas .....   | 34        |
| 4.4 Experimento 2 .....   | 35        |
| 4.4.1 Inducción de los callos morfogénéticos .....                                | 35        |
| 4.4.2 Regeneración de plantas .....   | 36        |
| 4.4.3 Formación de microbulbos .....  | 37        |
| 4.4.4 Aclimatación de las plantas en el invernadero .....                         | 38        |
| 5.1 Desinfestación y establecimiento del material vegetal .....                   | 39        |
| 5.2 Ensayo .....  | 42        |
| 5.2.1 Inducción de los callos morfogénéticos .....                                | 42        |
| 5.2.2 Regeneración de plantas .....   | 43        |
| 5.3 Experimento 1 .....   | 44        |
| 5.3.1 Inducción de los callos morfogénéticos .....                                | 44        |
| 5.3.2 Regeneración de plantas .....   | 46        |
| 5.4 Experimento 2 .....   | 48        |
| 5.4.1 Inducción de los callos morfogénéticos .....                                | 48        |
| 5.4.2 Regeneración de brotes adventicios .....                                    | 49        |
| 5.4.3 Porcentaje de explantes que formaron brotes adventicios .....               | 49        |
| 5.4.3.1 Efecto del genotipo .....   | 49        |
| 5.4.3.2 Efecto del medio de cultivo .....   | 50        |
| 5.4.3.3 Efecto de la interacción genotipo y medio de cultivo (tratamientos) ..... | 51        |
| 5.4.4 Número de brotes adventicios por gramo de callo .....                       | 52        |
| 5.4.4.1 Efecto del genotipo .....   | 52        |
| 5.4.4.2 Efecto del medio de cultivo .....   | 54        |
| 5.4.4.3 Efecto de la interacción genotipo y medio de cultivo (tratamientos) ..... | 56        |
| 5.4.5 Bulbificación y aclimatación de las plantas regeneradas .....               | 57        |
| <b>VI. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>61</b> |
| <b>VII. LITERATURA CITADA .....</b>   | <b>62</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Bulbo de ajo en donde se aprecia disco basal (tallo verdadero), las hojas envolventes (catáfilas), el cuello de la planta y el tallo floral. ....  | 6  |
| Figura 2. Corte transversal de un bulbo de ajo en donde se aprecia el arreglo de los dientes.....  | 7  |
| Figura 3. Escapo floral e inflorescencia en plantas de ajo.....  | 8  |
| Figura 4. Bulbos y dientes de ajo de la variedad Barretero. ....   | 10 |
| Figura 5. Bulbos de ajo variedad CEZAC 06 en donde se observa el color característico de las catáfilas. ....   | 11 |
| Figura 6. Bulbo de ajo de la variedad Cor P4 (Platero) en donde se aprecian los colores de las hojas envolventes y el color de la pulpa de los dientes. ....   | 13 |
| Figura 7.- Principales países productores de ajo (ProMendoza, 2016) .....  | 22 |
| Figura 8. Distribución de la producción de ajo por estados de la República Mexicana para 2013 (SIAP, 2015). ....   | 23 |
| Figura 9. (a) Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por el hongo <i>Sclerotium cepivorum</i> , nótese la marchitez de las plantas, el pobre sistema radical, la pudrición semiacuosa, el micelio algodonoso y (b) la alta producción de esclerocios. .... | 25 |
| Figura 10. Metodología para inducir la formación de callos organogénicos a partir de ápices de raíz de cinco variedades de ajo. ....   | 37 |
| Figura 11. a) Dientes de ajo enraizados, b) dientes de ajos contaminados con <i>Penicillium alli-sativi</i> .....  | 42 |
| Figura 12. Callos formados en el medio C2 (a), y C1 (b) después de 30 días de cultivo. .   | 42 |
| Figura 13. Estructuras formadas en los callos de ajo cultivados en los medios R1 y R2 para la regeneración de brotes adventicios. a) raíces vitrificadas y masas de células con clorofila; b) estructuras similares a brotes adventicios anormales. ....                 | 44 |
| Figura 14. Inicio de la formación de callo en los explantes de raíz después de 15 días de cultivo .....  | 45 |
| Figura 15. Callos formados en medios de cultivo a base de las sales MS, dicamba, BAP (a) y 2,4-D, BAP (b) después de 15 días de cultivo.....   | 46 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 16. Estructuras formadas en los callos cultivados en los diferentes medios de regeneración. a) brotes adventicios anormales, b) masas celulares muy compactas con brotes y raíces, c) brotes adventicios vitrificados. ....              | 48 |
| Figura 17. Callos cultivados en el medio R5 que formaron zonas de crecimiento verdes.   | 49 |
| Figura 18. Porcentaje de explantes (callos) de cinco variedades de ajo que regeneraron brotes adventicios.....  | 50 |
| Figura 19. Porcentaje de explante (callos) de cinco variedades de ajo que formaron brotes adventicios. ....   | 51 |
| Figura 20. Efecto de la interacción del genotipo y medio de cultivo en el porcentaje de explantes (callos) que formaron brotes adventicios en cinco variedades de ajo. ....   | 52 |
| Figura 21. Efecto de la variedad en el número de brotes adventicios regenerados por gramo de callo de cinco variedades de ajo. ....   | 53 |
| Figura 22. Brotes adventicios regenerados a partir de callo de las variedades Sainero (a), Barretero (b), CEZAC (c), Cor P4 (d), y Jas P4 (e). ....   | 54 |
| Figura 23. Efecto del medio de cultivo en el número de brotes adventicios regenerados a partir de ápices de raíz de cinco variedades de ajo. C6: 1 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina; C7: 0.5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina. .... | 55 |
| Figura 24. Callos regenerando brotes adventicios en los medios C6 (1 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D y cinetina) (a) y C7 (0.5 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D y cinetina) (b). ....  | 56 |
| Figura 25. Efecto la interacción medio de cultivo y la variedad en la formación de brotes adventicios. C6: 1.0 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina; C7: 0.5 mg L <sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina. ....                                     | 57 |
| Figura 26. Microbulbos de la variedad CEZAC de ajo después de 15 días en el medio de cultivo con 6 % de sacarosa. ....  | 58 |
| Figura 27. Plantas de cinco variedades de ajo, después de 45 días de transferirlas al invernadero. ....   | 59 |
| Figura 28. Protocolo para la regeneración de plantas de ajo ( <i>Allium sativum</i> L.). ....   | 60 |

## LISTA DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Peso de bulbos de ajo de la variedad Barretero de acuerdo a su calibre. ....   | 10 |
| Cuadro 2. Peso de bulbos de ajo de la variedad CEZAC 06 de acuerdo a su calibre. ....  | 12 |
| Cuadro 3.- Principales países exportadores de ajo (ProMendoza, 2016).....  | 23 |
| Cuadro 4. Medios de cultivo para inducir la formación de callo en explantes de raíz de tres variedades de ajo. ....  | 32 |
| Cuadro 5. Composición de los diferentes medios de cultivo probados para la regeneración de brotes adventicios a partir de callos provenientes de ápice de raíces de tres variedades de ajo. .... | 33 |
| Cuadro 6. Medios de cultivo para inducir la formación de callo en explantes de raíz de cinco variedades de ajo. ....   | 34 |
| Cuadro 7. Composición de los diferentes medios de regeneración de brotes adventicios a partir de explantes de ajo expuestos a sorbitol. ....   | 35 |
| Cuadro 8. Efecto de los tratamientos de desinfestación aplicados a dientes de ajo de distintas variedades. ....  | 40 |
| Cuadro 9. Tratamientos en los que se formaron brotes adventicios. ....   | 47 |

## I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta monocotiledónea que se emplea en gran parte del mundo como condimento y por sus propiedades medicinales. De acuerdo a la FAO durante el 2011 se cultivaron 1'422,335 hectáreas de ajo en el mundo con una producción de 23'710,768 toneladas (FAO, 2014), de las cuales 5,675 hectáreas se sembraron en la República Mexicana con una producción de 58,065 toneladas para el mismo año. El ajo es uno de los cultivos más importantes para la agricultura mexicana debido al ingreso y valor de su producción. Cincuenta y tres por ciento del ajo producido en nuestro país se consume en fresco, 10% se industrializa y el restante 37% es exportado. De 2010 a 2011, en México las exportaciones de ajo crecieron en 20.6 %, y de 2012 a 2013 nuestro país estuvo dentro los 10 principales países exportadores, lo que lo convierte en una fuente importante fuente de divisas (FAOSTAT, 2016) (ProMendoza, 2016).

Los principales estados productores de ajo a nivel son Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla, Baja California, Nuevo León y Aguascalientes, de los cuales Zacatecas aporta 47 % de la producción con más de 2000 hectáreas por ciclo (SIAP, 2016).

El Campo Experimental Calera (Zacatecas) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias (INIFAP) como resultado de su programa de mejoramiento genético de ajo, ha generado algunas variedades (CEZAC, Barretero, Cor P4, Sainero, Jas P4) con características promisorias en cuanto a rendimiento, calidad, precocidad, etc., pero que son susceptibles a la pudrición blanca. El ajo se reproduce exclusivamente en forma vegetativa, proceso que da como resultado un bajo coeficiente de multiplicación y la transmisión de enfermedades (Novak, 1990). El cultivo de tejidos (micropropagación) es una técnica que podría ayudar a incrementar la tasa de multiplicación y mejorar la calidad fitosanitaria de los propágulos, ya sea mediante el cultivo de meristemos o ingeniería genética.

Contar con un protocolo eficiente de propagación *in vitro* serviría para incrementar la tasa de multiplicación de estos genotipo sobresalientes y llevar a cabo

investigaciones sobre ingeniería genética. Aunque ya existen protocolos para la micropropagación de distintas variedades de ajo, para las variedades Cor P4, Jas P4, Barretero, Sainero y CEZAC, no se conocen trabajos al respecto, y dado que la respuesta *in vitro* está en función del genotipo es necesario establecer y optimizar los protocolos de propagación para éstas. Por lo anterior, en la presente investigación se plantaron los siguientes objetivos:

## II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

### 2.1 Objetivo general

Establecer las condiciones de cultivo para la regeneración *in vitro* de genotipos sobresalientes de ajo (Cor P4, Jas P4, Barretero, Sainero y CEZAC).

### 2.2 Objetivos específicos

-Estudiar el efecto de auxinas (dicamba y 2,4-D), sales nutritivas (Murashige y Skoog y Chu *et al.*) y sorbitol en la inducción de callos organogénicos.

-Determinar el efecto del genotipo en la regeneración *in vitro* de plantas.

### 2.3 Hipótesis general

Las condiciones de cultivo *in vitro* establecidas permitirán la regeneración eficiente de plantas de genotipos sobresalientes de ajo.

### 2.4 Hipótesis específicas

El dicamba y las sales de Chu *et al.*, promoverán la formación de callos embriogénicos con mayor eficiencia que el 2,4-D y las sales de Murashige y Skoog.

La aplicación de condiciones hiperosmóticas con sorbitol en el medio de cultivo incrementará la frecuencia de callos embriogénicos.

La respuesta morfogénica (formación de plantas) está en función del genotipo de ajo.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3. 1 Origen e historia del cultivo del ajo

El ajo (*Allium sativum* L.), al igual que la cebolla (*Allium cepa* L.), es una planta que tuvo su origen el Asia Central donde el antecesor directo del ajo *Allium longicuspis* Regel, es una especie endémica; sus propiedades terapéuticas y usos se conocen desde hace más de 3000 años, aunque algunos autores remiten su uso desde 4000 años antes de Cristo. En la actualidad este producto es valorado por su sabor y su uso en la preparación de una infinidad de platillos, mientras que la investigación continúa para descubrir y afinar su utilidad con fines medicinales (Lucier y Biing-Hwan, 2000 Boriss; 2006).

No se sabe con exactitud cuándo fue descubierto el ajo por el hombre, De Candolle en su libro “Origen de las Plantas Cultivadas” afirma que posiblemente las tribus nómadas difundieron su uso hace miles de años las cuales lo llevaron de Asia Menor a Egipto y de allí a Mesopotamia, la India y Europa. En el siglo VIII A.C., el ajo crecía en el jardín del rey de Babilonia; el ajo es mencionado por los eruditos chinos en las escrituras en sánscrito en el año 3000 A.C.; los sumerios incluían al ajo en su dieta como un ingrediente básico hacia el año 4000 A.C., es mencionado en el Shih Ching (Libro poético) escrito en la época de Confucio en China; los antiguos egipcios le rendían adoración como un dios siendo su nombre invocado a menudo en los juramentos oficiales; se llegó a utilizar para comprar esclavos pagando 15 libras (cerca de 5 kilogramos) para comprar un esclavo sano. Durante la construcción de las pirámides egipcias los trabajadores consumían dietas basadas principalmente en cebolla y ajo del que se decía proporcionaba energía para resistir la dura faena (Peña-Iglesias, 1988; Ajo directo, 2006).

#### 3.2. Descripción taxonómica

Del ajo, cuyo nombre científico es *Allium sativum* L. se relacionan los siguientes acontecimientos con relación a su clasificación taxonómica de las angiospermas realizada por Melchior en 1964 ubico al género *Allium* en la familia Liliaceae;

Clasificaciones realizadas posteriormente, lo ubicaron en la familia Amarillidaceae o Alliaceae con base en la estructura de la inflorescencia, (Fritsch and Friesen, 2002). El National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2016), propone la siguiente clasificación taxonómica.

Superreino: *Eukaryota*

Reino: *Viridiplantae*

Phyllum: *Streptophyta*

Clase: *Liliopsida*

Superorden: *Lilliflorae*

Orden: *Asparagales*

Familia: *Amaryllidaceae (Alliaceae)*

Subfamilia: *Allioideae*

Tribu: *Allieae*

Género: *Allium*

Especie: *Allium sativum*

### **3.3. Descripción botánica**

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta herbácea constituida por un bulbo subterráneo formado por "dientes" unidos en su base alrededor del tallo verdadero y recubiertos por catafilos blancos o morados (Figura 1), cuya tonalidad varía según la variedad y la altura del sitio de siembra (Ramos, 1991).

Los cultivares de ajo generalmente se clasifican por el color del bulbo, el tamaño, la forma, el porte vegetativo y el número, forma y color de los dientes (Heredia y Delgadillo, 2000). El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2002)

también ha incorporado en la descripción de sus variedades el nivel de pungencia (picor) y las características organolépticas, nutracéuticas e industriales.

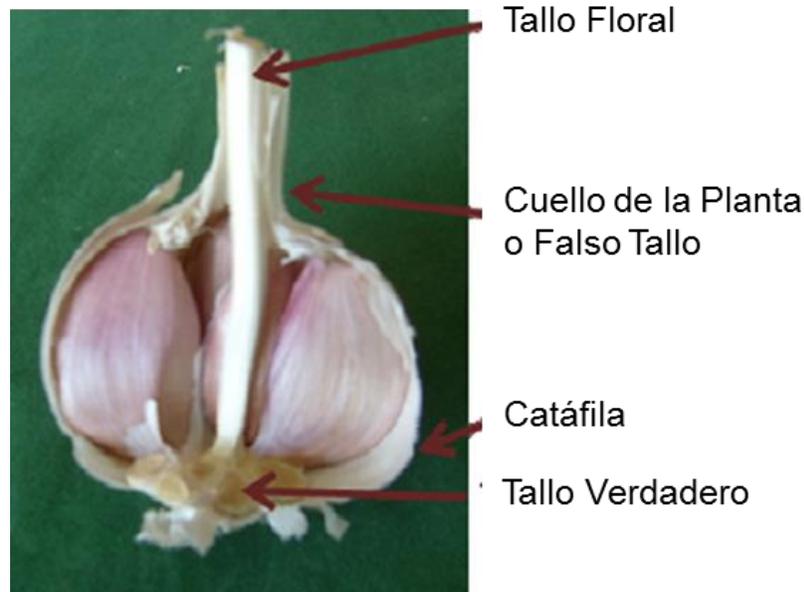


Figura 1. Bulbo de ajo en donde se aprecia disco basal (tallo verdadero), las hojas envolventes (catáfilas), el cuello de la planta y el tallo floral.

El bulbo está compuesto de varios dientes unidos en su base, los cuales que se forman en las axilas de las hojas en número de seis o siete en adelante, por lo que se les considera hojas transformadas que sirven para almacenar reservas de la planta (Figura 2). Los dientes están envueltos de manera individual por túnicas interiores, mientras que el bulbo completo está envuelto por túnicas exteriores transparentes membranosas de coloraciones que van del blanco al rojizo o púrpura y que se forman en el interior de las hojas envainadas (Kamenetsky y Rabinowich, 2006).



Figura 2. Corte transversal de un bulbo de ajo en donde se aprecia el arreglo de los dientes.

El número de dientes puede variar desde seis hasta 20 en la mayoría de los casos, aunque se llegan a encontrar bulbos con 40 o más dientes, como es el caso de algunos materiales criollos de los estados de San Luis Potosí o Nuevo León (Reveles-Hernández *et al.*, 2009).

Las hojas son largas, alternas, comprimidas y sin nervaduras aparentes. El tallo o escapo floral en cuya parte superior aparece la inflorescencia en forma de umbela esferoidal cubierta por una bráctea grande, membranosa y caduca se asoma por el centro de las hojas, es hueco, muy rollizo y lampiño, crece de 40 a más de 55 cm. La umbela está constituida por flores pequeñas con seis sépalos y pétalos de color blanco o rosado así como seis estambres y un pistilo que al madurar dan origen a un fruto con tres cavidades, cada una con dos semillas, (si es que llegan a desarrollarse) las cuales no son empleadas para fines de reproducción (Figura 3) (Sarita, 1995; Peña-Iglesias 1988; Kemper, 2000).



Figura 3. Escapo floral e inflorescencia en plantas de ajo.

### 3.4. Variedades

Las variedades comerciales de ajo han sido clasificadas en diferentes grupos; sin embargo algunas veces la diferencia entre ellos no es muy clara por lo que a continuación se presenta una guía para definir diferentes grupos de variedades:

*Allium sativum* var., *sativum* son los ecotipos más comunes de ajos “rosados”, “violetas”, “blancos” y “colorados”, mientras que *A. sativum* var *pekinense* corresponde a los ajos “morados”, más llamados “chinos”. *A. sativum* var *ophioscorodon* son los ajos “castaños”, más llamados “rusos” o “polacos” (Burba, 2008).

De acuerdo a la coloración el ajo se clasifica en:

- Violetas o asiáticos
- Rosados
- Blancos
- Colorados, rojos y morados.

Según el tipo de tallo en:

- Ajo de cuello duro: el tallo florece y genera hijuelos.

- Ajo de cuello blando: no produce hijuelos y por lo tanto tienen mejor rendimiento, ya que sólo utilizan la energía para la producción del bulbo. También resisten períodos de almacenamiento más prolongados en comparación con el ajo de cuello duro.

Tiscornia (1976) señala que el *Allium sativum*, de un modo general, tiene tres variedades sobresalientes: ajo blanco, rosado y rojo o violeta.

En México el Campo Experimental Zacatecas del INIFAP ha llevado a cabo trabajos de investigación para determinar el comportamiento agronómico de diversos materiales que se consideran promisorios, entre los que se incluyen las líneas avanzadas: Jaspeado P4 (Jas P4), Jaspeado Chaparrosa (antes Ensenada-ENS) y Jaspeado Calera (CEZAC) (ciclo precoz), Barretero, Sainero y Coreano P4 (Cor P4) (ciclo intermedio) (Reveles, 2007).

#### **3.4.1 Variedad Barretero**

La selección de esta variedad inició a partir de muestras obtenidas de lotes de productores de la región de Chaparrosa municipio de Villa de Cos, Zacatecas (Reveles-Hernández *et al.*, 2014).

La planta de la variedad Barretero tiene un hábito de crecimiento semi-erecto y alcanza hasta 60.7 cm de altura; Los bulbos están cubiertos por varias hojas modificadas o capas llamadas catáfilas de color blanco que presentan vetas verticales de coloración rosa violáceo, el número promedio de dientes por bulbo es de 13, cuyo color de la pulpa es blanco crema y están cubiertos individualmente por una hoja envolvente de coloración rosa obscuro (Figura 4).



Figura 4. Bulbos y dientes de ajo de la variedad Barretero.

El ciclo de cultivo de la variedad Barretero es considerado intermedio, con una duración de 220 días. Dentro de las ventajas de esta variedad destaca tener mayor homogeneidad en la forma y tamaño de bulbo; además de que su densidad relativa de bulbo (peso por bulbo del mismo calibre) es alta (Cuadro 1) (Reveles *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Peso de bulbos de ajo de la variedad Barretero de acuerdo a su calibre.

| <b>Calibre</b>          | <b>11</b> | <b>10</b> | <b>9</b> | <b>8</b> | <b>7</b> | <b>6</b> | <b>5</b> |
|-------------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Diámetro en milímetros  | 70-75     | 65-70     | 60-65    | 55-60    | 50-55    | 45-50    | 40-45    |
| Peso promedio en gramos | 110.11    | 97.37     | 79.14    | 60.80    | 57.60    | 42.71    | 22.60    |

Fuente: Reveles *et al.*, 2014

El rendimiento promedio de esta variedad es de 23. 238 t ha<sup>-1</sup>. La mejor fecha de siembra para esta variedad en el altiplano de Zacatecas es entre el 20 de septiembre y el 20 de octubre, ya que fechas de siembra posteriores a la primer semana de noviembre afectan negativamente el rendimiento de manera significativa (Reveles, 2007a). La variedad de ajo Barretero se adapta favorablemente a las

condiciones del altiplano de Zacatecas y áreas similares, con altitudes de 2000 metros sobre el nivel del mar o superiores.

### **3.4.2 Variedad CEZAC 06**

A partir de bulbos de ajo de origen coreano, se inició el mejoramiento, obteniéndose un material de tipo jaspeado que en el año 2011 se obtuvo su registro ante el Catalogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) número AJO-008-231110 y con el nombre oficial “CEZAC 06”.

El hábito de crecimiento de las plantas de esta variedad es erecto, con una altura promedio de 42.8 centímetros; en general son plantas muy vigorosas lo que se refleja en la robustez de su falso tallo (1.6 cm), la presencia de escapo floral es una característica de la variedad. Los bulbos están cubiertos por catáfilas de color blanco que presentan vetas verticales de coloración rosa violácea (Figura 5).



Figura 5. Bulbos de ajo variedad CEZAC 06 en donde se observa el color característico de las catáfilas.

El ciclo de cultivo de la variedad CEZAC 06 es considerado intermedio, con una duración de 220 días. Dentro de sus ventajas relativas con relación a otras variedades del mismo tipo sembradas en la región, destacan tener mayor

homogeneidad en la forma y tamaño de bulbo. El contenido de sólidos totales en sus dientes es intermedio, mientras que los azúcares reductores son altos. Lo anterior significa que la variedad CEZAC 06 se encuentra en condiciones de competir con las variedades sembradas en la región por su contenido de azúcares; asimismo, tiene mayor vida de anaquel que otras variedades, ya que pierde menos del 6.0 % de su peso en condiciones de almacenamiento (90 días), mientras otras pierden hasta 60.6 % (Velásquez-Valle *et al.*, 2010a; Velásquez-Valle *et al.*, 2010b). El peso de sus bulbos puede ir de 30 a 115 gramos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Peso de bulbos de ajo de la variedad CEZAC 06 de acuerdo a su calibre.

| <b>Calibre</b>          | <b>10</b> | <b>9</b> | <b>8</b> | <b>7</b> | <b>6</b> | <b>5</b> |
|-------------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Diámetro en milímetros  | 65-70     | 60-65    | 55-60    | 50-55    | 45-50    | 40-45    |
| Peso promedio en gramos | 115.0     | 96.7     | 76.9     | 59.7     | 44.3     | 30.1     |

Los ensayos experimentales, han demostrado que la variedad CEZAC 06 crece bien en Chihuahua, Aguascalientes y Zacatecas. El rendimiento promedio de esta variedad es de 24.85 t h<sup>-1</sup>. Durante el ciclo 2009-2010 la variedad CEZAC 06 ocupó cerca del 48% de la superficie sembrada con esta hortaliza en el estado de Zacatecas (Reveles-Hernández y Velásquez-Valle, 2010; Reveles y Velásquez, 2010a).

### **3.4.3 Variedad Cor P4 (Platero)**

La variedad Platero se genera a partir de la colecta de plantas de ajo de origen Coreano. A los materiales o clones seleccionados de esta serie se les identificó con las iniciales COR, seguidas por el número consecutivo del clon de tal manera que después de seis años de selección de los clones con mayor estabilidad productiva se obtuvo a CORP4 como el mejor clon de la serie (Reveles *et al.*, 2014a).

La planta de la variedad Cor P4 tiene follaje de tipo semi-erecto, con un máximo de 10 hojas activas, en condiciones de buen manejo emite escapo floral con curvatura, pero al madurar se hace recto, la altura máxima de las plantas es de 61 cm y se logra alrededor de los 175 días después de la siembra (UPOV, 2001).

Las catáfilas o capas que cubren a los bulbos son de color blanco con vetas de coloración rosa violáceo dispuestas de manera vertical; el número promedio de bulbillos o dientes es de 15. El color de los dientes es blanco a crema, cubiertos individualmente por una hoja envolvente de coloración rosa; se encuentran distribuidos de manera radial y dispuestos, insertada en el tallo (Figura 6).



Figura 6. Bulbo se ajo de la variedad Cor P4 (Platero) en donde se aprecian los colores de las hojas envolventes y el color de la pulpa de los dientes.

El rendimiento promedio de la variedad Cor P4 es de 24.66 t h<sup>-1</sup>, muy cercano al de la variedad CEZAC, la cual es un referente; sin embargo, al evaluar la producción de bulbos de tamaño comercial, Cor P4 superó en cerca de un 20% al CEZAC (Cid *et al.*, 2014a; Cid *et al.*, 2014b; Reveles *et al.*, 2014a).

Los resultados experimentales obtenidos demuestran que la variedad Cor P4 se adapta a siembras tardías (segunda quincena de noviembre); sin embargo, para la obtención de mejores rendimientos se recomienda su establecimiento entre el 16 de septiembre y el 15 de octubre.

#### **3.4.4 Variedad Jas P4**

Es un clon proveniente de ajo tipo coreano que ha tenido comportamiento agronómico sobresaliente entre más de 270 clones evaluados. Se obtuvo a través de colectas de materiales en terrenos de productores de Zacatecas durante el año 2006-2007.

#### **3.4.5 Variedad Sainero**

Es un material criollo que se obtuvo en el municipio de Saín Alto del estado de Zacatecas.

### **3.5 Mejoramiento Genético**

#### **3.5.1 Selección clonal**

Un clon es un material genéticamente uniforme, derivado de un solo individuo que se propaga exclusivamente en forma vegetativa, como el caso de la planta de ajo, que se reproduce sólo a través de bulbillos o dientes (Robledo-Paz, 2000).

La selección clonal puede llevarse a cabo en poblaciones mezcladas de especies de propagación asexual y consiste en escoger fenotípicamente dentro de dicha población, clones sobresalientes. Una vez que se ha seleccionado el mejor fenotipo que debe representar el mejor genotipo, la multiplicación vegetativa mantiene dicho genotipo sin ninguna variación, hasta que se produzcan quimeras o mutaciones, que generalmente no son beneficiosas (Salazar, 2002).

#### **3.5.2 Selección clonal masal**

Es más efectiva desde el punto de vista de los volúmenes de “semilla” alcanzados, pero se demora más para encontrar los mejores resultados (Burba, 1997). Conlleva a seleccionar importantes cantidades de bulbos “ideales” (buena forma, sanidad y compacidad), se calibran y eliminan los de diámetro más pequeño (los menores de 45 o 50 mm). Los bulbos se desgranán, los dientes se clasifican y se plantan solamente los de mayor peso (por ejemplo, mayor a 2 gramos). Durante el cultivo

se pueden eliminar plantas fuera de tipo y a partir de la cosecha se vuelven a repetir los pasos descritos. De esta manera, en 4 ó 5 años se puede contar con muy buen material, bastante homogéneo y adaptado a las condiciones locales (Burba, 2009).

### **3.5.3 Selección clonal individual**

Este tipo de selección por lo general la realizan los organismos oficiales; alcanza más rápido los objetivos propuestos, pero es más lenta para obtener grandes cantidades de “semillas” disponibles.

Para este tipo de selección a partir de una población local se estudia la frecuencia de caracteres deseables (formas, colores, calibres, número de dientes, etc.) y se define el ideotipo. Se eligen todos aquellos bulbos que respondan al ideotipo y cada bulbo constituye una familia. Los dientes de cada bulbo se plantan en una parcela individual. El número de familias no debería ser inferior a cien.

Durante el cultivo se analiza el comportamiento de cada familia y se eliminan todas aquellas que muestran anomalías indeseables (síntoma de virosis, plantas dobles, etc.). Luego de la cosecha se analiza para cada familia el rendimiento (diámetro, peso y PER: peso específico relativo), y se eliminan todas aquellas familias con mal o regular comportamiento (Burba, 1997).

Repetiendo este proceso, en el transcurso de seis o siete años puede lograrse una nueva variedad de ajo, este nuevo material, luego de inscribirse formalmente en un registro, pasa a la etapa de producción de “semilla” (Burba, 2009).

### **3.5.4 Mutagénesis**

El manejo de mutágenos conlleva evaluar los efectos biológicos generados en una determinada célula o tejido, a lo que se deben considerar factores como el tipo de mutágeno, la dosis de radiación empleada, el tamaño, procedencia de los explantes y su radiosensibilidad (Taner y Kunter, 2004). Debido a que la respuesta a un determinado mutágeno se mide en función del porcentaje de supervivencia, la tasa de regeneración y/o multiplicación del material irradiado, es necesario determinar la dosis de radiación que permite la sobrevivencia de los materiales y posteriormente

seleccionar entre estos el mayor número de mutantes con características deseables (Pardo, 2015)

En ajo se han realizado investigaciones a partir de bulbos tratados con radiación gamma con el objeto de mejorar características como resistencia a enfermedades (Al-Safadi et al., 2000; Nabulsi et al., 2001), inhibición de la brotación (Crocì et al., 1987; Taner y Kunter, 2004; Pérez et al., 2007), ganancia de peso (Crocì y Curzio, 1983), mayor vida de anaquel (AL-Safadi, 2000), inhibición de la germinación (Pellegrini et al., 2000; Wi et al., 2007) y modificaciones en el sabor (Ceci et al., 1991).

Por otro lado, la combinación de técnicas como el cultivo de tejidos y mutagénesis han facilitado, en varios cultivos agrícolas, la regeneración de un gran número de variantes deseables, el desarrollo de materiales libres de plagas y enfermedades y la posibilidad de irradiar un alto número de explantes (Zheng et al., 2007).

### **3.5.5 Variación somaclonal**

La variación somaclonal es un fenómeno que ocurre por la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos, a través de la cual pueden recuperarse mutantes con o sin ventajas adaptativas. Larkin y Scowcroft (1981) distinguieron claramente dos tipos de causas: la variación epigenética transitoria, debida probablemente a las condiciones de estrés generadas por las condiciones propias del cultivo de tejidos y células in vitro, y las variaciones genéticas “verdaderas”, producto de mutaciones azarosas. En cualquier caso, el fenómeno se conoce como variación somaclonal.

Las variaciones epigenéticas, debido a su naturaleza, son inestables y se revierten con una alta frecuencia en las líneas celulares, sin que haya consecuencias fenotípicas en las plantas regeneradas (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009). Por el contrario, la variación somaclonal de origen genético sí se transmite y expresa en la descendencia de las plantas regeneradas. Cuando esta capacidad intrínseca de variación de los cultivos crecidos in vitro es potencializada a través de la adición de un agente de selección al medio de cultivo, es posible obtener variantes

“somaclonales” con tolerancia a ese agente de selección; esta técnica se denomina “selección in vitro” (Lestari, 2006).

A nivel molecular, la ocurrencia de variación somaclonal está asociada a mutaciones puntuales, rearrreglos y recombinaciones cromosómicas, metilación del ADN, alteración en el número de copias de segmentos de ADN, y ocurrencia de elementos transponibles (Jain, 2001).

En ajo, Koch y Salomón, (1994) encontraron que las plantas de ajo del cultivar Frankon regeneradas in vitro a partir de placas basales mostraban mayor tamaño del bulbo y variaciones en el color, con respecto al material original, lo que podría representar un material prometedor para la generación de mejores variantes somaclonales. Así como en el número y tamaño de dientes por bulbo en las plantas regeneradas in vitro a partir de placas basales, al cultivar placas basales in vitro con respecto al material en comparación con el tipo de planta madre.

Badria y Ali (1999) Identificaron variantes somaclonales regeneradas de callos obtenidos a partir de meristemos de la raíz, las cuales formaron bulbos sin división en la primera generación, y mostraron fenotipo normal en la siguiente generación, después de cuatro ciclos en el campo, se encontraron variantes somaclonales, para las características del bulbo. En el análisis citogenético descubrieron que estas variantes somaclonales tenían el mismo número de cromosomas que las plantas madre. La cuantificación de la producción alliicina mostró que algunos somaclones contenían tres veces más de este compuesto (14.5 mg g<sup>-1</sup>) que las plantas testigo (38 mg g<sup>-1</sup>), ellos sugieren que esta técnica podría ser útil para mejorar el contenido alliicina en el ajo.

### **3.5.6 Transformación genética**

Se denominan plantas transgénicas a aquellas plantas que fueron modificadas genéticamente por la introducción de uno o varios genes, por técnicas moleculares, que les confieren una(s) nueva(s) característica (Martínez et al. 2004; Vain, 2007).

La ingeniería genética de plantas está dirigida a la producción de genotipos que expresen características de interés, mediante la integración en el genoma vegetal,

de segmentos de DNA foráneo, proveniente de cualquier origen. Este DNA altera las características de la planta, mediante la modificación dirigida y controlada de su genoma, al añadir, o modificar alguno o algunos de sus genes (Danilova, 2007; Karimi et al., 2007). Esta técnica permite usar genes de diferentes especies, géneros y reinos, eliminando las barreras de incompatibilidad sexual y fertilidad (Vasil, 2007).

La principal ventaja de la ingeniería genética es que no implica la transferencia de cientos de miles de genes, algunos que codifican a características no deseadas, sino que involucra uno o pocos genes (Danilova, 2007). La ingeniería genética de plantas es una tecnología complementaria a los procedimientos del mejoramiento genético convencional (Jauhar, 2006; Livermore, 2002).

Para todas las técnicas de transformación vegetal es necesario disponer de un gen de interés, que puede ser endógeno modificado o un gen foráneo aislado de grupos filogenéticos variados (Karimi et al., 2007). Este debe ir flanqueado por los elementos reguladores necesarios para su expresión: una región promotora, cuya función general es el reconocimiento del sitio de unión de la DNA polimerasa con el consecuente inicio de la transcripción del gen en mRNA y una región terminadora que da la señal de finalización de la transcripción, y es la encargada del mantenimiento de la estabilidad del mRNA y su transporte al citoplasma para su posterior traducción en una molécula proteica. La construcción: región promotora, región codificante o gen de interés y región terminadora, es conocida como casete de expresión (Sharma et al., 2002; Chaparro et al., 2005).

Para obtener una planta transgénica deben ocurrir tres procesos indispensables en la misma célula: el casete de expresión debe ser transferido al interior de la célula; luego éste se debe integrar al DNA celular y se debe regenerar una planta, a partir de la célula en la que han ocurrido los dos procesos anteriores (Díaz et al., 2004). Este casete de expresión debe ir en un vector que permita su clonación o transferencia, mediante los métodos de transformación. Los vectores más utilizados en la transformación de plantas son plásmidos, donde fueron clonados los genes que serán introducidos en el genoma vegetal (Larik et al., 2004; Job, 2002; Karimi

et al., 2007). La construcción quimérica, usualmente, se encuentra acompañada a un gen marcador de selección. La introducción de este gen responde a la necesidad de identificar las plántulas que hayan sido regeneradas a partir de células que incorporaron el transgen (Bhat y Srinivasan, 2002; Martínez et al., 2004; Karimi et al., 2007).

Una vez se logra la regeneración de las plantas transgénicas a partir de células transformadas, se debe realizar la verificación del estatus transgénico de estas plantas, mediante el uso de técnicas moleculares, como PCR o “Southern blot”, para determinar la inserción del transgen, RT-PCR o “Northern blot”, para verificar su transcripción y “Western Blot” o ELISA, para detectar la producción de la proteína producto de la expresión del gen (Díaz et al., 2004; Danilova, 2007).

Robledo-Paz et al., (2004) usaron el bombardeo de microproyectiles para introducir ADN en un callo embriogénico de ajo del cultivar 'GT96-1'. Dichos callos fueron bombardeados con el plásmido (pWRG1515) que contenía los genes *hpt* y *gusA* que codifican la higromicina fosfotransferasa y  $\beta$ -glucuronidasa, respectivamente. Callos putativamente transformados se identificaron en el tejido bombardeado después de 4 meses de selección en 20 mg L<sup>-1</sup> de higromicina B. La naturaleza transgénica del material seleccionado se demostró mediante el ensayo histoquímica de GUS y análisis Southern blot; fue posible recuperar 20 plantas transgénicas resistentes a higromicina.

Lagunes-Fortiz et al., (2009) utilizaron la cepa LBA 4404 que contenía el plásmido pCAMBIA 2301 con los genes *TaCh* (que codifica para quitinasa) y *glu* (que codifica para glucanasa), *gus* (codifica para  $\beta$ -glucuronidasa) y el gen *nptII* (codifica para neomicina fosfotransferasa). Se obtuvieron 30 clones presuntamente transgénicas. El ensayo histoquímico mostró actividad *gusA* intensa en 43% de las clones obtenidas. En el PCR confirmó que el 92% de las clones evaluadas llevaban el gen *TaCh*. Las plantas se desarrollaron normalmente y crecieron bien en invernadero. Los bioensayos de confrontación in vitro de las plantas regeneradas con el hongo *Sclerotium cepivorum* mostraron un porcentaje de invasión de micelio de 41 a 60% en las plantas transgénicas y de 80% en las no transgénicas (testigo). Aunque las

plantas transformadas no fueron completamente resistentes tuvieron mayor tolerancia al patógeno que las plantas no transgénicas.

Zheng et al., (2004) Realizaron un sistema de transformación, aparte de la producción de plantas resistentes a los antibióticos o herbicidas, también permitió la introducción de genes de resistencia a los insectos. Inocularon callos de tres cultivares europeos que se llevó a cabo usando el AGLO cepa que lleva cuatro plásmidos diferentes: gusA, genes hpt, cry1Ca y genes HO4 de *Bacillus thuringiensis*, que confiere resistencia al insecto *Spodoptera exigua*. La frecuencia de transformación más alta (1,47%) se logró con el cultivar Printanor y el plásmido pPB34. De las plantas regeneradas, solamente los que integran el gen cry1Ca tenido un buen crecimiento en condiciones de invernadero y tenía la capacidad de formar bulbos. Estas plantas fueron totalmente resistentes a la *Spodoptera exigua* en bioensayos realizados in vitro

### **3.6 IMPORTANCIA (usos)**

Después de la cebolla, el ajo es el segundo producto más importante por su uso en la alimentación como saborizante o condimento en la cocina para preparar diversos platillos alrededor del mundo, su principal consumo es en fresco, además se usa deshidratado o procesado de diversas maneras (Zepp *et al.*, 1996).

Los usos del ajo tiene gran variación, desde los relacionados con la preparación de alimento, hasta los curativos relacionándolo desde tiempos ancestrales con un sin números de enfermedades en las que se ha probado y comprobado su eficiencia desde el punto de vista empírico y científico, como antiséptico, como estimulante, en el tratamiento de la presión arterial y otras enfermedades cardiovasculares, ha sido usado como antibiótico, antioxidante, reductor de colesterol y triglicéridos, en la prevención de cáncer de estómago y colon, también se le atribuyen propiedades preventivas en el caso de enfermedades coronarias, anticoagulante, y con éxitos en infecciones en la piel, se ha usado en el tratamientos de alergias, bronquitis, diabetes mellitus, llegándosele a considerar un elemento “curalotodo” (Reveles-Hernández *et al.*, 2009).

Es una excelente fuente de vitamina B1 y también contiene minerales y vitaminas necesarias para el adecuado funcionamiento del cuerpo humano (Thompson *et al.*, 2006; Barak *et al.*, 2007).

Kemper (2000) establece que los activos químicos del ajo son componentes azufrados: alina, alicina, ajoene, disulfuro de alilpropil, trisulfuro de alilo, s-allylcysteina, vinilditinas, S-allylmercaptocisteina y otros; enzimas: alinasa, peroxidasas, mirosinasa y otras. Aminoácidos y sus glucósidos: arginina, Selenio, Germanio, Telurio y otros elementos traza.

La Agencia de Protección al Ambiente (EPA por sus siglas en inglés), indica que los extractos y polvos a base de ajo se han usado como repelentes de pájaros, insectos, hongos, trips, áfidos, gusanos, bacterias y nematodos, mosca blanca (EPA, 1992; Castro *et al.*, 1996; Diniz *et al.*, 2006; Roselló, 2003; Hasan *et al.*, 2005; Montes *et al.*, 2000).

Los extractos de ajo también se han usado eficientemente en la promoción de la brotación de cultivos como la vid, lo que se ha comprobado al utilizarse como compensadores de frío en el cultivo de uva de mesa producida orgánicamente en Sonora (Vargas-Aispuro *et al.*, 2008).

### **3.7 Principales países productores y exportadores**

La producción mundial de ajos y el comercio internacional han venido experimentando un sostenido aumento, como consecuencia del cambio de los hábitos de consumo hacia una alimentación más saludable y del reconocimiento de sus propiedades terapéuticas, como las de prevenir el cáncer, entre otras.

Los principales países productores son, en su mayoría, países asiáticos que son consumidores tradicionales: China, India, República de Corea, Rusia y Egipto (ProMendoza, 2016) (Figura 7).

China, España y Argentina son los principales exportadores mundiales; pese a ser Chile un país productor y exportador tradicional de ajos y de haber logrado un

reconocimiento por la calidad del producto, el cultivo sufrió un continuo deterioro por diversos factores, que lo llevó a ser un cultivo poco atractivo para muchos agricultores que terminaron por abandonarlo (Monardes *et al.*, 2009; ProMendoza, 2016).

### 3.8 Situación del cultivo del ajo en México

México pasó del lugar 18 entre los países productores en el 2000, al lugar 25 en el 2013 (ProMendoza, 2016). El Comité Nacional de Sistema Producto Ajo (CONAJO) atribuye este comportamiento al estancamiento del comercio del producto nacional debido a la introducción ilegal de ajo de otros países, principalmente de China, aun cuando la calidad, sabor y condiciones sanitarias de ese producto son inferiores a las del producto nacional (CONAJO, 2009). Por otro lado, nuestro país ocupa la posición 9 de los países exportadores (Cuadro 3) (FAOSTAT, 2016; ProMendoza, 2016).

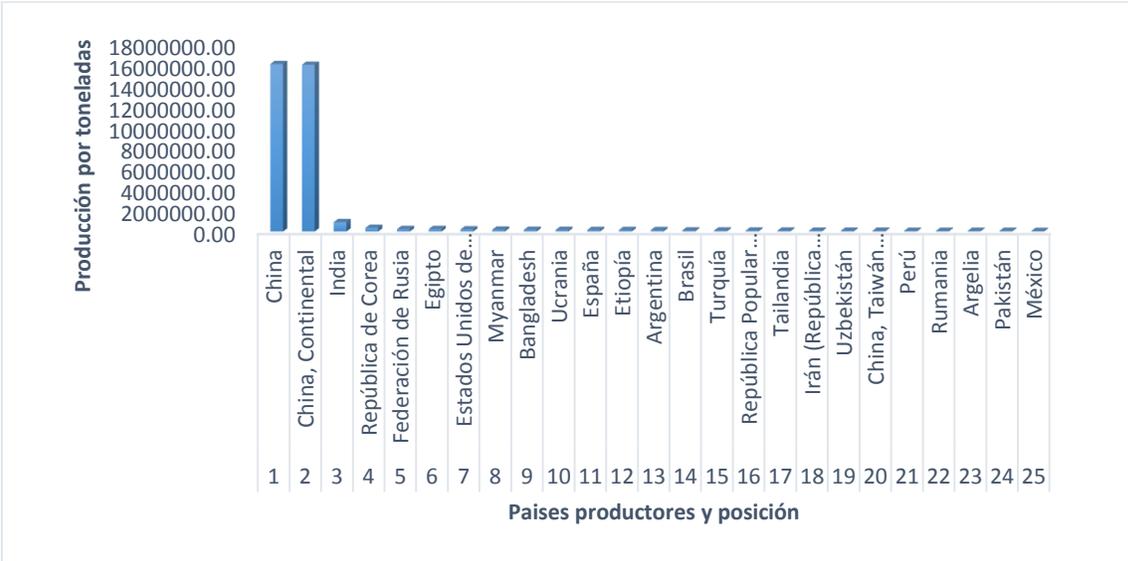


Figura 7.- Principales países productores de ajo (ProMendoza, 2016)

Cuadro 3.- Principales países exportadores de ajo (ProMendoza, 2016).

| Indicadores comerciales      |  |                                     |                            |                    |                              |
|------------------------------|--|-------------------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------------|
| Exportadores                 | Valor exportada en 2014 (miles de USD) | Saldo comercial 2014 (miles de USD) | Cantidad exportada en 2014 | Unidad de cantidad | Valor unitario (USD/ unidad) |
| Mundo                        | 2,065,598.00                           | - 14,289.00                         | 2,107,001.00               | Toneladas          | 980.00                       |
| China                        | 1,473,204.00                           | 1,473,203.00                        | 1,752,057.00               | Toneladas          | 841.00                       |
| España                       | 221,500.00                             | 213,367.00                          | 124,475.00                 | Toneladas          | 1,779.00                     |
| Argentina                    | 107,624.00                             | 107,624.00                          | 74,918.00                  | Toneladas          | 1,437.00                     |
| Países Bajos                 | 60,048.00                              | 10,792.00                           | 26,119.00                  | Toneladas          | 2,299.00                     |
| Francia                      | 35,548.00                              | - 47,065.00                         | 9,049.00                   | Toneladas          | 3,928.00                     |
| Italia                       | 35,466.00                              | - 22,599.00                         | 11,166.00                  | Toneladas          | 3,176.00                     |
| Chile                        | 22,345.00                              | 19,095.00                           | 10,119.00                  | Toneladas          | 2,208.00                     |
| Estados Unidos de América    | 18,744.00                              | - 124,884.00                        | 10,031.00                  | Toneladas          | 1,869.00                     |
| México                       | 12,231.00                              | - 13,512.00                         | 12,043.00                  | Toneladas          | 1,016.00                     |
| India                        | 7,603.00                               | 7,551.00                            | 16,496.00                  | Toneladas          | 461.00                       |
| Malasia                      | 7,470.00                               | - 71,894.00                         | 19,171.00                  | Toneladas          | 390.00                       |
| Reino Unido                  | 7,272.00                               | - 39,639.00                         | 3,963.00                   | Toneladas          | 1,835.00                     |
| Irán, República Islámica del | 6,049.00                               | 5,933.00                            | 4,396.00                   | Toneladas          | 1,376.00                     |
| Bélgica                      | 6,048.00                               | - 10,535.00                         | 1,629.00                   | Toneladas          | 3,713.00                     |
| Emiratos Árabes Unidos       | 5,009.00                               | - 36,366.00                         | 6,007.00                   | Toneladas          | 834.00                       |
| Alemania                     | 4,776.00                               | - 58,914.00                         | 1,648.00                   | Toneladas          | 2,898.00                     |

### 3.9 Estados productores de ajo en México

Para el año 2013 los principales estados productores de ajo eran Zacatecas, Guanajuato, Sonora, Puebla y Baja California (Figura 8) (SIAP, 2015).

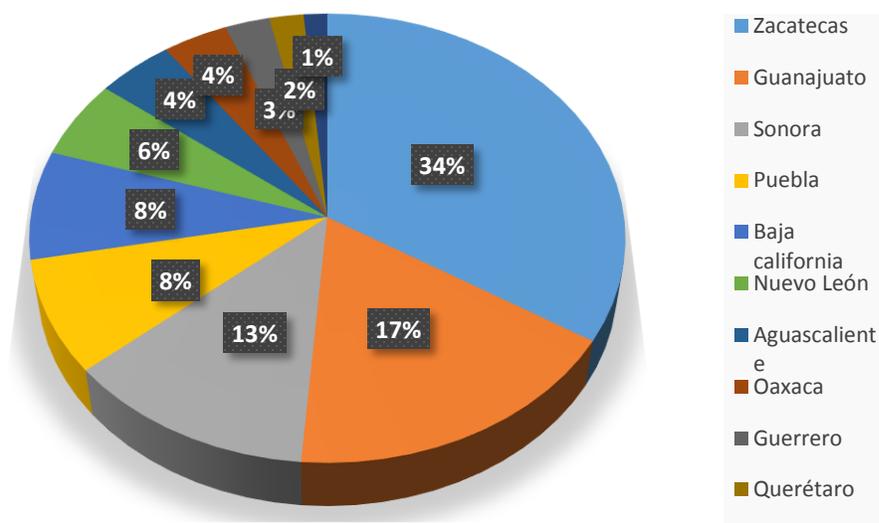


Figura 8. Distribución de la producción de ajo por estados de la República Mexicana para 2013 (SIAP, 2015).

### 3.10 Plagas y enfermedades del ajo

El cultivo de ajo es infectado por distintos virus que pueden reducir la producción de 25 a 50%. Se han identificado cuatro tipos de virus: Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV), Leek Yellow Stripe Virus (LYSV), Garlic Yellow Streak Virus (GYSV) y Shallot Latent Virus (SLV) (Walkey, 1987).

Asimismo, la planta de ajo puede ser afectada por el nemátodo del ajo (*Ditylenchus dipsaci*), insectos chupadores (Trips), ácaros (*Rhizoglyphus* spp.), mosca de la cebolla (*Phorbia antiqua* Meig), polilla (*Laspeyresia nigricana* Steph), la mancha púrpura causada por el hongo *Alternaria porrielli*, Mildú (*Peronospora destructor*), pudrición del bulbo (*Fusarium oxysporum*), marchitez del follaje (*Sclerotium rolfsii*) y pudrición blanca entre otros (*Sclerotium cepivorum*) (Heredia-García y Delgadillo-Sánchez, 2000).

#### 3.10.1 Pudrición blanca

La pudrición blanca fue asociada primero con el cultivo de la cebolla en el Reino Unido en 1841 y luego con ajo en Italia en el año 1903. Después de esos primeros informes, la enfermedad fue registrada en todo el mundo (Pinto *et al.*, 1998; Couch y Kohn, 2000).

La pudrición blanca se presenta en la mayoría de las zonas productoras de ajo de México y es causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk. Esta enfermedad constituye el problema sanitario más importante de este cultivo, ya que en áreas con alta incidencia llega a causar la pérdida de hasta el 80% de la producción. En Zacatecas, más del 93 % de las parcelas que se dedican al cultivo de ajo poseen diversos grados de infestación por este patógeno (Velásquez y Medina, 2004).

Los esclerocios que produce *Sclerotium cepivorum* tienen la función de garantizar la sobrevivencia del hongo por largos periodos de hasta 10 años o más, aún en ausencia de los cultivos como ajo y cebolla que producen compuestos volátiles y solubles en agua, que estimulan la germinación de estas estructuras, aunque estén a 10 cm de distancia. El desarrollo óptimo de la enfermedad se asocia con

temperaturas entre 17 y 20 °C, las cuales son comunes en Zacatecas entre diciembre y marzo (Valle, 1989; Reveles-Hernández *et al.*, 2009).

El primer síntoma coincide con el período de bulbificación y se presenta como un amarillamiento general, continuado por muerte descendente de las hojas más externas y retardo del crecimiento. Simultáneamente, en las raíces y hojas inferiores hay abundancia de micelio blanco, lanoso y superficial que pronto produce esclerocios negros y esféricos sobre la superficie o dentro de los tejidos enfermos (Weber 1973; Galli *et al.*, 1980; Crowe 1995, Pinto *et al.*, 1998) (Figura 9).

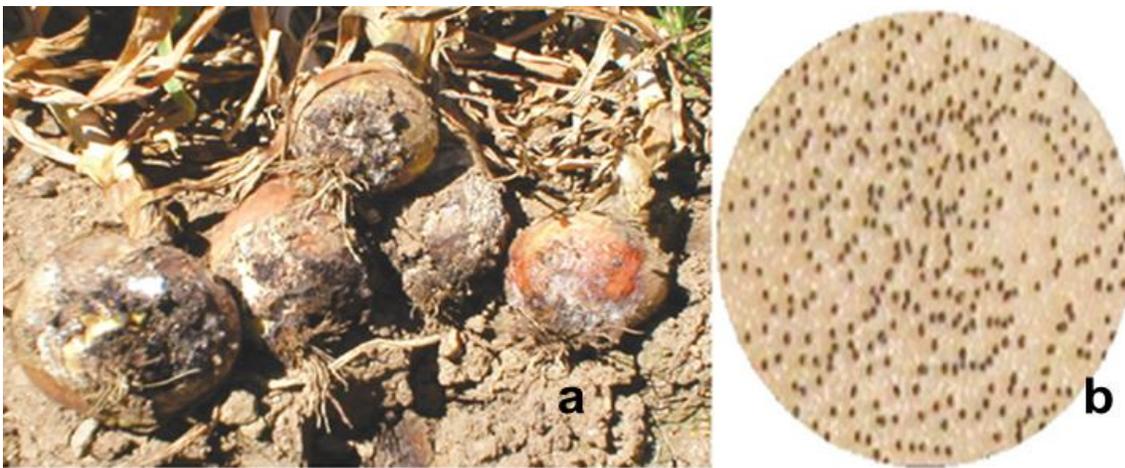


Figura 9. (a) Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum*, nótase la marchitez de las plantas, el pobre sistema radical, la pudrición semiacuosa, el micelio algodónoso y (b) la alta producción de esclerocios.

### 3.11 Obtención y manejo de semillas

La ausencia de un programa de producción de “semillas” de amplia cobertura ha ocasionado que los materiales de siembra utilizados provengan de áreas diversas, sin la certeza de que hayan sido producidos en parcelas con buenas condiciones fitosanitarias. Lo anterior ha provocado la diseminación de plagas y enfermedades (Ramos, 1988; Velásquez, 1992; Velásquez *et al.*, 2002).

Se debe asegurar la sanidad rigurosa del sitio donde se ubicará la parcela de producción de semilla; no deberá tener antecedentes de enfermedades como pudrición blanca o nemátodos. Para tener la seguridad de esto, se recomienda tomar una o varias muestras del suelo previo a la siembra, para que se determine la presencia de hongos o nemátodos (Velásquez y Medina, 2007).

En ningún caso, la semilla deberá adquirirse en las bodegas de los mercados de abasto, supermercados, fruterías o establecimientos similares, debido al desconocimiento de su origen y sanidad (Bachman, 2001).

### **3.11.1 Propagación**

El ajo es una planta agámica, por lo que la vía de propagación se lleva a cabo mediante bulbillos o “dientes” que se forman en cada ciclo, lo que ocasiona baja tasa de multiplicación (Fellner *et al.*, 1996). La casi exclusiva multiplicación por dientes y bulbillos confiere al ajo una gran homogeneidad en sus características, lo cual explica el número limitado de variedades botánicas que se cultivan.

### **3.11.2 Propagación por cultivo de tejidos (micropropagación)**

#### **3.11.2.1 Micropropagación**

La micropropagación es una de las técnicas del cultivo de tejidos más utilizada para la propagación masiva de plantas. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permiten la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Krikorian, 1991).

Existe dos principales vías para la micropropagación de plantas: embriogénesis somática y la organogénesis (Phillips *et al.*, 1995).

#### **3.11.2.2 Embriogénesis somática**

La embriogénesis es un proceso morfogénico por el cual se generan embriones a partir de células somáticas en cultivo. Los embriones somáticos (ES) siguen las

mismas etapas de desarrollo que los embriones cigóticos pero no son el resultado de la fecundación de los gametos.

La estructura bipolar del embrión somático contiene tanto los meristemas del vástago como de la raíz. Asimismo, es posible distinguir las distintas fases de desarrollo que se presentan en la embriogénesis cigótica (globular, corazón, torpedo). La embriogénesis somática se puede producir directamente a partir de células del tejido del explante sin intervenir una fase de callo (embriogénesis directa) o con la formación previa de callo (embriogénesis indirecta). Sin embargo; la vía de la embriogénesis indirecta es la más utilizada (Pierik, 1987; Rashid, 1988).

Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. La embriogénesis somática no sólo se considera un sistema de gran importancia para la propagación clonal a gran escala, transformación genética y crioconservación, sino que también es un sistema de gran utilidad para realizar estudios de carácter fundamental, a nivel anatómico y molecular, sobre la regulación de la inducción y desarrollo de los embriones.

### **3.11.2.3 Organogénesis**

La organogénesis es una de las vías morfogenéticas en la cual se diferencian meristemas de vástago o raíz a partir de las células o tejidos cultivados. La organogénesis consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraízan. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (organogénesis indirecta) (Jiménez González, 1998).

La regeneración de órganos puede inducirse a partir de meristemas preexistentes (yemas axilares) o de meristemas que se generan *de novo*. Los brotes adventicios que provienen de meristemas preexistentes presentan menores índices de variación

genética que los que se originan *de novo*, especialmente cuando hay una fase de callo previa (organogénesis indirecta) (Paniego, 1995; Rice *et al.*, 1992).

#### **3.11.2.4 Micropropagación de ajo**

Hassan *et al.* (2014) cultivaron ápices de las raíces de la variedad Japones en diferentes combinaciones reguladores del crecimiento para inducir callos y embriones somáticos. Los explantes que se cultivaron en un medio con las sales de Murashige y Skoog (MS) con 1.0 mg L<sup>-1</sup> ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) formaron callo en alta frecuencia (86%). Cuando los callos se expusieron a 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 6-furfurilaminopurina (cinetina) se observó el número más alto de embriones somáticos por explante (4.6).

Por otro lado, Scotton *et al.* (2013) utilizaron segmentos de raíz como explantes para la regeneración *in vitro* de ocho variedades de ajo (Jonas, Amarante-Embrapa, IAC 63-Mexicano Br, Cajuru 2315, IAC 75-Gigante de curitibanos, Cateto Roxo, Roxinho 5063, Lavínia 1632). Los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con 4.5 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.5 µM de 2-isopentenil (2iP) y 0.2 g L<sup>-1</sup> hidrolizado de caseína. Los callos formados se transfirieron a un medio suplementado con 8.8 µM de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.1 µM ácido naftalenacético (ANA) o 4.6 µM de 6-furfurilaminopurina (cinetina). La variedad: Jonas, mostró la tasa de regeneración de brotes más alta (3.6).

Asimismo, Pardo *et al.* (2011) establecieron un protocolo para la regeneración de plantas de ajo tipo morado (clon UCLA-1) a partir de segmentos de hojas y raíces. Ellos probaron el efecto de la combinación de ANA, 2,4-D, BAP, cinetina, ácido 4-aminotricloropicolínico (picloram) y 2iP. Los explantes extraídos de la sección apical de las raíces fueron más eficiente para formar callos que los segmentos de hoja cuando se cultivaron en un medio con 2 mg L<sup>-1</sup> de picloram y 1 mg L<sup>-1</sup> de 2iP durante 3 meses. La máxima regeneración de brotes (24.5) ocurrió en un medio que contenía 0.01 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina.

Robledo-Paz *et al.* (2000) cultivaron ápices de raíz de los cultivares ABEN y GT96-1 en los medios de basales de Chu *et al.* (N6) y MS con 2,4-D (2.2 a 4.5  $\mu\text{M}$ ), solo o combinado con cinetina (2.3 a 4.6  $\mu\text{M}$ ). Los brotes comenzaron a diferenciarse después de tres semanas de transferir los explantes a un medio de cultivo con las sales N6 y 4.4  $\mu\text{M}$  de BAP. Fue posible obtener hasta 170 plantas en un medio suplementado con 4.6  $\mu\text{M}$  de cinetina y 4.5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D. Las plantas regeneradas produjeron microbulbos seis semanas más tarde.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Se utilizaron cinco variedades de ajo (*Allium sativum* L.): CEZAC (Calerense), Jaspeado (Jas P4), Coreano (Cor P4), Sainero y Barretero, las cuales fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental de Calera, Zacatecas, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y Pecuarias (INIFAP).

### 4.2 Desinfestación

Se probaron dos métodos de desinfestación y establecimiento del material vegetal en condiciones de asepsia:

**Método 1.** A los dientes de las variedades Sainero, ENSP-9 y Calerense (CEZAC) se les retiró las hojas de protección (catáfilas) que los cubrían para después sumergirlos durante 15 horas en una solución fungicida que contenía 4.0 mL L<sup>-1</sup> de Ridomil Gold Bravo® sc (Syngenta), 2.0 g L<sup>-1</sup> de Promyl®, 2.0 g L<sup>-1</sup> de Fungimycin®. Transcurrido este tiempo, los dientes se trataron con una solución de hipoclorito de sodio 30 % (v/v) (1.8 % de cloro activo, Cloralex®) más 30 gotas L<sup>-1</sup> de Microdyn® por 20 min. Posteriormente, los dientes se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

### Establecimiento *in vitro*

Los dientes desinfestados fueron sembrados en frascos de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo de “germinación”; los dientes fueron colocados con la placa basal en contacto con el medio. Dicho medio contenía las sales de Murashige y Skoog (MS) al 50 % de su concentración, 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 6 g L<sup>-1</sup> de agar y un pH 5.7 ± 0.1; este medio fue previamente esterilizado en una autoclave a 121 °C durante 20 min. Los frascos se colocaron durante tres días en una cámara de ambiente controlado a 25°C ± 2 y un fotoperiodo de 16 horas.

**Método 2.** A los dientes de las variedades Calerense (CEZAC), Jaspeado (Jas P4), Coreano (Cor P4), Sainero y Barretero, se les retiró las hojas de protección y luego se colocaron en una solución fungicida que contenía 4.0 mL L<sup>-1</sup> de Ridomil Gold Bravo®, 2.0 g L<sup>-1</sup> de Promyl®, 2.0 g L<sup>-1</sup> de Fungimycin® y 4.0 g L<sup>-1</sup> de Prozycar 50%® en la que permanecieron durante 16 horas. Después, los dientes se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio 30 % (v/v) (1.8 % de cloro activo, Cloralex®) durante 20 minutos y luego a una que contenía 360 µL L<sup>-1</sup> de una solución de nanopartículas de plata (AgROVIT®, AgNPs 20 %) durante 60 minutos.

### **Establecimiento *in vitro***

Los dientes una vez desinfectados se colocaron en frascos con medio MS al 50 %, 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 6 g L<sup>-1</sup> de agar y 45 µL L<sup>-1</sup> de nanopartículas de plata (“medio de germinación”). En cada frasco se sembró un diente de ajo, las raíces de los dientes no contaminados fueron utilizadas como explante para los experimentos de regeneración de plantas.

## **4.2 Ensayo**

### **4.2.1 Inducción de los callos morfogénicos**

Segmentos de 3-5 mm (explantes) obtenidos de las raíces desarrolladas a partir de los dientes de ajo de las variedades Sainero, ENSP-9 y Calerense (CEZAC), cultivados en el (medio de germinación), fueron colocados en cajas Petri (10 explantes por caja) que contenían 30 mL de los dos medios de cultivo que se describen en el Cuadro 4. Todos los medios fueron elaborados con las sales MS y suplementados con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel; el pH de los éstos se ajustó a 5.7 ± 0.1.

Cuadro 4. Medios de cultivo para inducir la formación de callo en explantes de raíz de tres variedades de ajo.

| Medio | Composición (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----------------------------------|
| C1    | 2,4-D 1.0, BAP 0.5                |
| C2    | dicamba 1.0                       |

MS: sales de Murashige y Skoog (1962); 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: 6-bencilaminopurina.

Cada tratamiento (medio C1 y C2) consistió de 10 repeticiones cada uno, considerando como repetición una caja Petri con 10 segmentos de ápice de raíz.

#### 4.2.2. Regeneración de plantas

Los explantes cultivados en los distintos medios de inducción de callo, fueron transferidos a frascos con 30 mL de cuatro medios de cultivo (Cuadro 5), con el objeto de promover la regeneración de brotes adventicios a partir de ellos. Todos contenían las sales MS 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel; el pH de éstos se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$ . Los cultivos fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a  $25 \pm 2$  °C y 16 h de luz ( $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Después de 30 días de cultivo se evaluó el porcentaje de explantes que formaron callo y brotes adventicios.

Cada uno de los cuatro tratamientos probados (medios de cultivo) consistió de 10 repeticiones cada uno, en donde cada repetición consistió en un frasco con 500 mg de peso fresco de callo.

Cuadro 5. Composición de los diferentes medios de cultivo probados para la regeneración de brotes adventicios a partir de callos provenientes de ápice de raíces de tres variedades de ajo.

| MEDIO | COMPOSICIÓN ( mg L <sup>-1</sup> )                        |
|-------|---|
| R1    | Thidiazuron 1.0   |
| R2    | Ácido giberélico 1.0; agua de coco 100 mL L <sup>-1</sup> |
| R3    | BAP 2.0; agua de coco 100 mL L <sup>-1</sup>              |
| R4    | BAP 1.0; agua de coco 100 mL L <sup>-1</sup>              |

### 4.3 Experimento 1

#### 4.3.1 Inducción de los callos morfogénéticos

Segmentos de 3-5 mm obtenidos de las raíces formadas a partir de los dientes de ajo de las cinco variedades de ajo mencionadas anteriormente, se cultivaron en cajas Petri (8 explantes por caja) con 30 mL de los cuatro medios de cultivo que se muestran en el Cuadro 6, adicionados con 0.6 mM de sorbitol (109.3 mg L<sup>-1</sup>). En estos medios los explantes permanecieron durante 0, 5 y 10 días y posteriormente, se transfirieron a los mismos medios pero sin sorbitol. Todos los medios fueron complementados con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel y 3 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> y su pH se ajustó a 5.7 ± 0.1.

Los cultivos se incubaron en completa oscuridad en una cámara de ambiente controlado a 25 ± 2 °C. Los explantes se subcultivaron en los mismos medios cada 15 días durante 45 días.

El diseño experimental fue uno con 12 tratamientos resultado de la combinación de dos factores: sorbitol (0, 5 y 10 días) y medios de cultivo (C1, C2, C3 y C4). Cada

tratamiento consistió de 10 repeticiones considerando una caja Petri con 8 segmentos de ápice de raíz como una repetición.

Cuadro 6. Medios de cultivo para inducir la formación de callo en explantes de raíz de cinco variedades de ajo.

| Medio | Composición (mg L <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----------------------------------|
| C1    | MS, 2, 4-D 1.0; BAP 0.5           |
| C2    | MS, dicamba 1.0; BAP 0.5          |
| C3    | N6, 2,4-D 1.0; BAP 0.5            |
| C4    | N6, dicamba 1.0; BAP 0.5          |

MS: sales de Murashige y Skoog (1962); N6: sales de Chu *et al.* (1976); 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BAP: 6-bencilaminopurina.

#### 4.3.2 Regeneración de plantas

Los explantes que formaron callo en los distintos medios de inducción se cultivaron en los cuatro medios que se muestran en el Cuadro 7, para promover la formación de brotes adventicios. Dichos medios se complementaron con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel. El pH de los medios se ajustó a pH 5.7 ± 0.1 y luego se esterilizaron en una autoclave a 121 °C durante 20 min.

Cuadro 7. Composición de los diferentes medios de regeneración de brotes adventicios a partir de explantes de ajo expuestos a sorbitol.

| MEDIO | COMPOSICIÓN (mg L <sup>-1</sup> )  |
|-------|------------------------------------|
| R5    | MS, BAP 2.0                        |
| R6    | MS, BAP 1.0; TDZ 0.5               |
| R7    | N6, vitaminas MS; BAP 2.0          |
| R8    | N6, vitaminas MS; BAP 1.0, TDZ 0.5 |

MS: sales de Murashige y Skoog (1962); N6: sales de Chu *et al.* (1975); BAP: 6-bencilaminopurina; TDZ: Thidiazuron

El diseño experimental fue uno completamente al azar con cuatro tratamientos (medios R5, R6, R7 y R8) y 10 repeticiones en cada uno, considerando como una repetición un frasco con 500 mg de peso fresco de callo.

## 4.4 Experimento 2

### 4.4.1 Inducción de los callos morfogénicos

Segmentos de ápice (3-5 mm) de las raíces emergidas de los dientes de ajo de las variedades Calerense (CEZAC), Jaspeado (Jas P4), Coreano (Cor P4), Sainero y Barretero fueron sometidos al procedimiento que se muestra en la Figura 10, para inducir la formación de callo morfogénico. Los medios de cultivo utilizados fueron el C1 (2,4-D 1.0 mg L<sup>-1</sup>, BAP 0.5 mg L<sup>-1</sup>), C5 (BAP 1.0 mg L<sup>-1</sup>), C6) 1.0 mg L<sup>-1</sup> tanto de 2,4-D como de 6-furfurilaminopurina (cinetina, K) y C7) 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina. Todos los medios fueron elaborados con las sales y vitaminas de MS, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 3 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>. El pH de los medios se ajustó a 5.7 ± 0.1 antes de ser esterilizado en una autoclave a 121 °C. Los explantes fueron incubados en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C en oscuridad completa,

excepto cuando se cultivaron en el medio C5 (Figura 10). Después de 60 días de cultivo se evaluó el porcentaje de explantes que formaron callo.

Este experimento fue completamente al azar con dos tratamientos (medios C6 y C7) y 10 repeticiones cada uno, considerando como una repetición una caja Petri con 8 segmentos de ápice de raíz.

#### **4.4.2 Regeneración de plantas**

Un gramo de los callos provenientes de los medio de inducción C6 y C7, descritos anteriormente, se colocó en frascos de 250 mL que contenía 30 mL del medio R5; en este medio los callos permanecieron durante tres semanas, y luego fueron transferidos al medio de desarrollo (MD) ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP). Todos los medios fueron elaborados con las sales basales de MS,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa,  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  y  $2.3 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel. Todos los cultivos se incubaron en una cámara de ambiente controlado a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  con 16 h de luz y una intensidad lumínica de  $25 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Después de seis semanas de transferir los callos al medio R5 se cuantificó el número los brotes adventicios por gramo de peso fresco de callo con ayuda de un microscopio estereoscópico.

El experimento fue uno completamente al azar con dos tratamientos (medios C6 y C7 en combinación con medio R5), cada uno con 16 repeticiones. Una repetición se conformó de un frasco con un gramo de callo embriogénico.

Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SAS (SAS 9.0 2002), y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

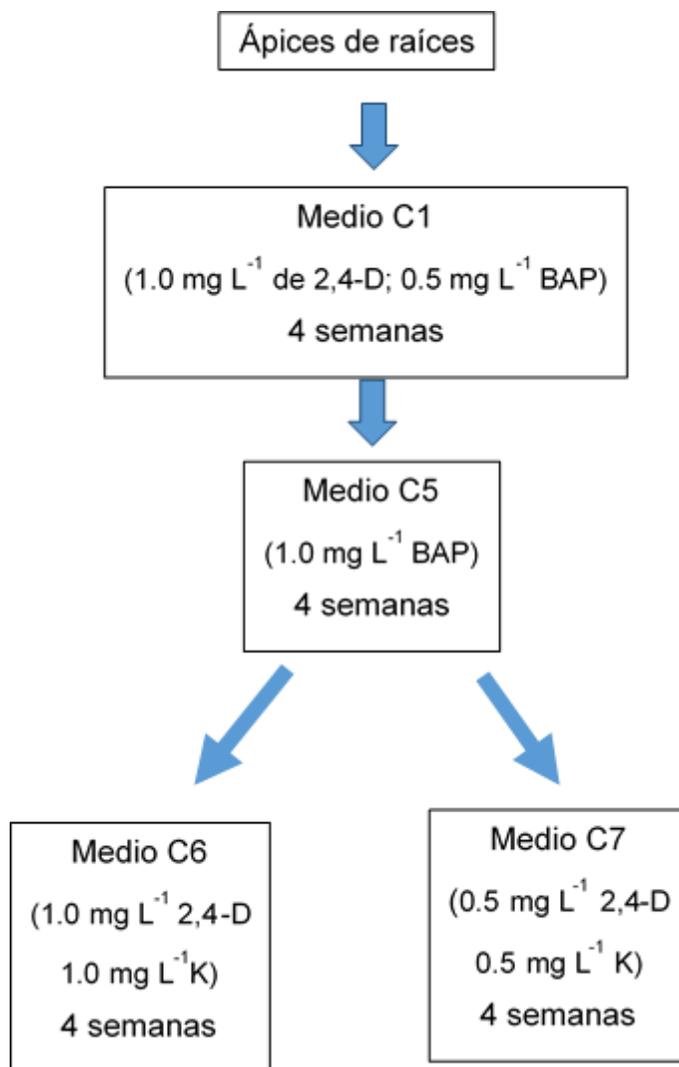


Figura 10. Metodología para inducir la formación de callos organogénéticos a partir de ápices de raíz de cinco variedades de ajo.

#### 4.4.3 Formación de microbulbos

Las plantas regeneradas fueron subcultivadas en frascos con 30 mL de un medio que contenía las sales MS, 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 3 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> y 2.3 de phytigel. El pH de este medio se ajustó a 5.7 ± 0.1. En este medio las plantas permanecieron durante 30 días.

#### **4.4.4 Aclimatación de las plantas en el invernadero**

Los microbulbos que se formaron en las plantas regeneradas *in vitro* se extrajeron de los frascos, se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos del phytigel y se sumergieron en una solución fungicida al 1% (Ridomil Gold) durante 5 minutos. Posteriormente, éstos se colocaron en vasos de unicel de un litro que contenían una mezcla de peat-moss: tezontle (1:2) como sustrato. Los vasos se cubrieron con bolsas de plástico, a las cuales se les hicieron perforaciones cada tres días durante 12. Después de este tiempo, las bolsas fueron retiradas. Las plantas fueron regadas con solución Steiner (1985) dos veces a la semana y con agua cada vez que la planta lo requirió.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Desinfestación y establecimiento del material vegetal

Leifert y Woodward (1998) consideran que la desinfestación representa uno de las etapas más importantes para el establecimiento exitoso y la respuesta de los tejidos en condiciones *in vitro*, por lo que se requiere desarrollar técnicas que permitan eliminar de manera eficiente los microorganismos localizados en la superficie de los tejidos. Para establecer una metodología de desinfestación se deberán tener en cuenta las condiciones en las que creció la planta madre (campo o invernadero), su estado fenológico, (entre más madura sea la planta mayor exposición tiene con agentes patógenos) y otras características de la planta como el nivel de pubescencia (Villegas, 1990).

La etapa de desinfestación del material vegetal en esta investigación fue determinante para establecer los cultivo *in vitro*, debido a que los bulbos de las diferentes variedades de ajo en estudio se obtuvieron directamente en el campo, y presentaban alta incidencia de hongos y bacterias. En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos después de tratar los dientes de ajo con dos métodos de desinfestación; en él se puede apreciar que utilizar el método 2 que consistió en tratar los dientes con una solución fungicida durante 16 h, seguido de una de hipoclorito durante 20 minutos y 1 hora en una solución de nanopartículas de plata (AgROVIT), además de incluir nano partículas en el medio de cultivo fue el mejor. Dicho método permitió eliminar hongos y bacterias hasta en 90 % del material vegetal y el enraizamiento de 80 % de los dientes (Figura 11a).

Cuadro 8. Efecto de los tratamientos de desinfección aplicados a dientes de ajo de distintas variedades.

| Método | Componentes (g L <sup>-1</sup> )   | Dientes contaminados (%) | Dientes con raíces (%) |
|--------|--|--------------------------|------------------------|
| 1      | Solución fungicida 15 h [Ridomil Gold Bravo, 4.0 mL L <sup>-1</sup> (Metalaxil-M 0.16 g y Clorotalonil 1.16 g)], Promyl 2.0 g L <sup>-1</sup> , y Fungimycin 2.0 g L <sup>-1</sup> )<br><br>Hipoclorito de sodio (1.8 %) + 1.3 mL L <sup>-1</sup> de microdyn (20 min)   | 60                       | 70                     |
| 2      | Solución fungicida (Ridomil 4.0 mL L <sup>-1</sup> , Promyl 2.0 g L <sup>-1</sup> , Fungimycin 2.0 g L <sup>-1</sup> y Prozycar 50% 4.0) (16 h)<br><br>Hipoclorito de sodio (1.8 %) (20 min)<br><br>-Solución con 360 µL L <sup>-1</sup> de AgROVIT (1 h).<br><br>-Medio de cultivo con 45 µL L <sup>-1</sup> de AgROVIT | 10                       | 80                     |

AgROVIT: 20 % nanopartículas de plata; microdyn: plata ionizada 0.082 %

Entre los agentes antimicrobianos inorgánicos, la plata ha sido ampliamente usada desde tiempos remotos para combatir infecciones y controlar la contaminación microbiana (Pal *et al.*, 2007). El efecto bactericida de los iones de plata en los microorganismos es bien conocido; sin embargo el mecanismo no es aún muy claro,

algunas propuestas han sido desarrolladas para explicar los efectos inhibitorios de iones plata y plata metálica en microorganismos (Cho *et al.*, 2005). Se plantea que los iones de plata interaccionan fuertemente con los grupos tiol de enzimas vitales, provocando su inactivación (Feng *et al.*, 2000). Es posible también que el ADN de bacterias tratadas con nanopartículas pierda su capacidad de replicación, esto por la afinidad de la plata a interaccionar con grupos fosforilados y azufrados (Pal *et al.*, 2007). En otros estudios se ha reportado que los iones de plata provocan cambios estructurales irreversibles en la membrana celular de las bacterias, afectando drásticamente sus funciones propias como permeabilidad y respiración (Cho *et al.*, 2005; Morones *et al.*, 2005).

(Rai *et al.*, 2008), menciona que el efecto bactericida de las nanopartículas de plata puede ser favorecido por la liberación de iones una vez que éstas han ingresado al interior de las células. Por su parte Cho *et al.*, (2005) reportaron una inhibición total de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al emplear 50 y 100 ppm de nanopartículas de plata, respectivamente. Kim *et al.* (2009) encontraron que nanopartículas de plata pueden retrasar el crecimiento del hongo *Raffaelea* sp., y que además la velocidad de crecimiento se reduce al aumentar la concentración de las partículas. Asimismo, las nanopartículas de plata tuvieron un efecto fungistático, logrando una inhibición de casi el 90 % hacia el fitopatógeno (*Colletotrichum gloesporioides*) al emplear 16 mL<sup>-1</sup> de solución coidal al medio de cultivo (Aguilar *et al.*, 2009).

Por otro lado, el uso del carbendazim (fungicida) tuvo un papel importante en la desinfección del material, ya que éste actúa sobre hongos como *Penicillium allisativi*, el cual fue identificado como uno de los contaminantes de los dientes de ajo (Figura 11b).

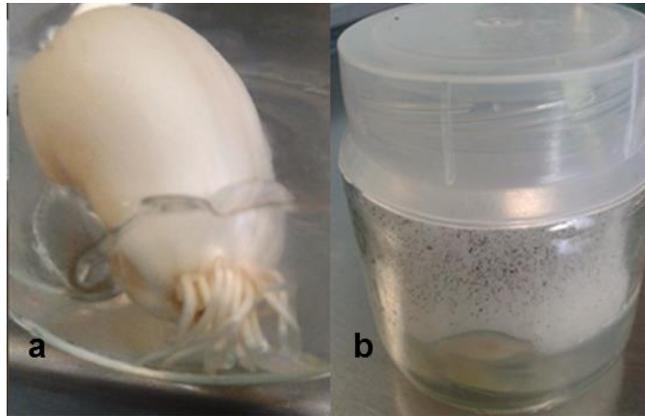


Figura 11. a) Dientes de ajo enraizados, b) dientes de ajos contaminados con *Penicillium alli-sativi*.

## 5.2 Ensayo

### 5.2.1 Inducción de los callos morfogenéticos

Los resultados mostraron que 100 % de los explantes cultivados tanto en el medio C1 que contenía 2,4-D y BAP, como el C2 al cual se le agregó dicamba formaron callo. Dicho callo era friable y de color beige. Cabe señalar que la presencia de dicamba en el medio indujo la división de las células a mayor velocidad que la combinación del 2,4-D y la BAP, lo que se reflejó en mayor biomasa (Figura 12 a y b).

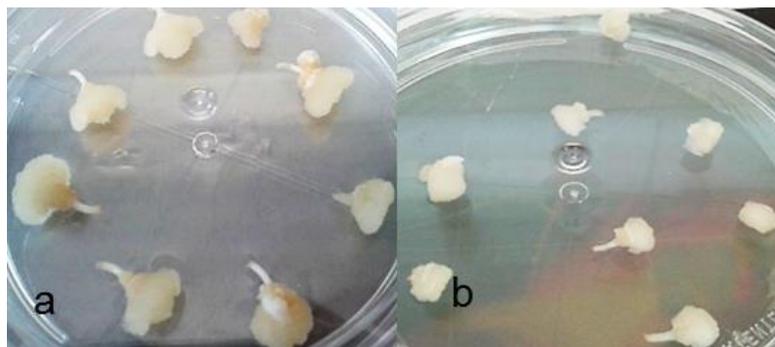


Figura 12. Callos formados en el medio C2 (a), y C1 (b) después de 30 días de cultivo.

### 5.2.2 Regeneración de plantas

Aunque los callos obtenidos en los medios de inducción mostraban consistencia friable, no formaron brotes adventicios normales en ningún de los medios de regeneración probados; sólo fue posible observar la formación de abundantes raíces, masas de células con clorofila y estructuras que parecían brotes adventicios anormales (Figura 13 a y b). Lo anterior pudo deberse a que los callos se subcultivaron durante 3 meses al mismo medio con 2,4-D, BAP o dicamba, tiempo en el cual las células pudieron haber sufrido cambios que se reflejaron en la morfología anormal de los brotes. Al respecto, Haque *et al.* (1997) revelan regeneración de brotes adventicios de ajo se volvieron morfológicamente anormales cuando se dejaron en el medio de inducción durante 60 días (sin subcultivarse) o cuando se subcultivaron después de 30 días en un medio con la misma concentración de reguladores.

Las plantas regeneradas de callos y células en suspensión pueden presentar una proporción variable de anomalías estructurales o fisiológicas, según la especie de planta, y el origen y la edad de los cultivos (Villalobos y Thorpe, 1991).

La humedad relativa y el potencial de agua son factores involucrados en una morfogénesis anormal "*in vitro*". Asimismo, factores nutricionales, carbohidratos y minerales, altos niveles de reguladores, baja intensidad luminosa, son las mayores causas que inducen malformaciones de los brotes adventicios (González, 1990).

El principal problema que puede presentarse durante los subcultivos sucesivos *in vitro* es la vitrificación. La cual consiste en un proceso de morfogénesis anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que producen hojas de una apariencia vidriosa. Este fenómeno está regulado por dos factores clave que son la humedad relativa y el potencial agua, y afecta a dos procesos fisiológicos fundamentales, la fotosíntesis y la transpiración. Debido a la disfunción metabólica asociada, las plantas se vuelven completamente heterótrofas y transpiran excesivamente debido a un mal funcionamiento estomático y a cambios estructurales en las paredes celulares. La principal consecuencia de la vitrificación

es la baja supervivencia de las plántulas obtenida durante la aclimatación *ex vitro* (Olmos *et al.*, 2010).

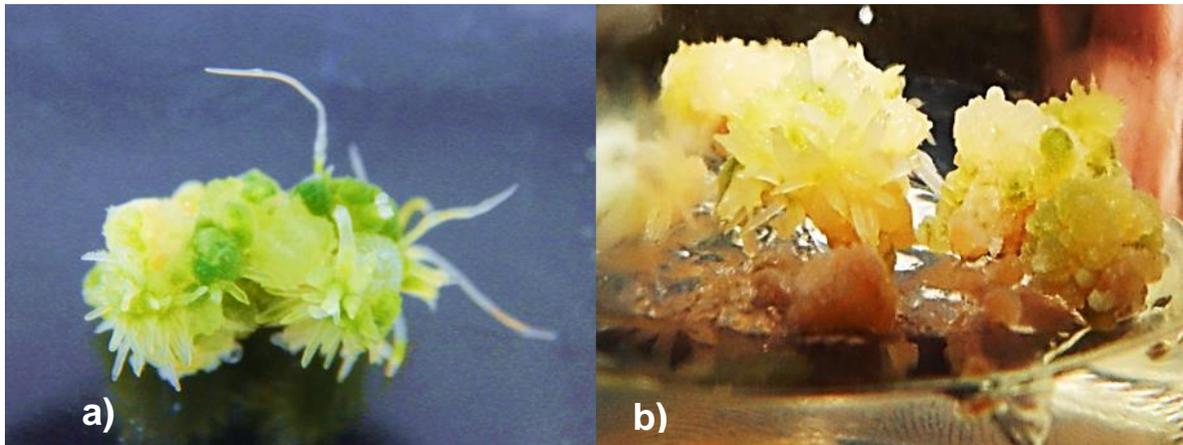


Figura 13. Estructuras formadas en los callos de ajo cultivados en los medio R1 y R2 para la regeneración de brotes adventicios. a) raíces vitrificadas y masas de células con clorofila; b) estructuras similares a brotes adventicios anormales.

### 5.3 Experimento 1

#### 5.3.1 Inducción de los callos morfogenéticos

El crecimiento de los callos fue visible 15 días después de iniciar el cultivo, originándose principalmente en la zona meristemática de la raíz (Figura 14).



Figura 14. Inicio de la formación de callo en los explantes de raíz después de 15 días de cultivo

No se encontraron diferencias en cuanto al porcentaje de explantes que formaron callo en los distintos medios de cultivo probados, ya que el 100 % mostró esta respuesta. Sin embargo, la formación de los callos fue más lenta cuando los explantes se expusieron durante 5 y 10 días al sorbitol. Además, los callos obtenidos sin sorbitol fueron más grandes y de consistencia friable, mientras que los de sorbitol eran callos pequeños y más compactos. La menor biomasa generada en los explantes expuestos al sorbitol probablemente se debió al estrés osmótico que ocasionó la presencia del sorbitol en el medio.

Por otro lado, el callo formado en los explantes que crecieron en los medios que contenían dicamba y BAP, se inició en menor tiempo y fue más abundante que en aquellos a los que se les adicionó 2,4-D y BAP (Figura 15). Esta respuesta probablemente se debe a que el dicamba es metabolizado más fácilmente por la célula que el 2,4-D, por lo que estimulan el crecimiento en forma desproporcionada, aumenta la respiración, la división y el alargamiento celular (Papenfuss y Carman, 1986; George y Sherrington, 1993), además de que induce la producción de etileno (Toro y Briones, 1995). Una respuesta similar observó Barrena *et al.* (2015) al cultivar tejido foliar de *Stevia rebaudiana* en medios que contenían dicamba o 2,4-D, solos o combinados con una citocinina. En caña de azúcar se logró un 70.83 % de callos embriogénicos en medio con dicamba ( $6.63 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que con 2,4-

D ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ ) 62.0 % de los explantes formaron callos embriogénicos (Alvez y Oropeza, 2015).

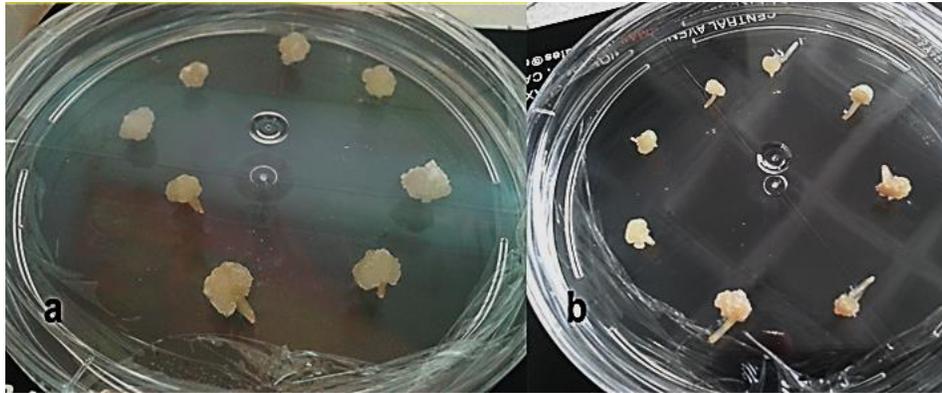


Figura 15. Callos formados en medios de cultivo a base de las sales MS, dicamba, BAP (a) y 2,4-D, BAP (b) después de 15 días de cultivo.

### 5.3.2 Regeneración de plantas

Los explantes de todas las variedades expuestos a sorbitol durante 10 días no formaron brotes adventicios en ninguno de los medios de regeneración y en otros únicamente se formaron brotes adventicios anormales, masas compactas de células con clorofila o raíces, por lo que en el Cuadro 9 sólo se muestran aquellos tratamientos en los que se observaron brotes adventicios normales. Como se puede observar, los explantes de todas las variedades en estudio cultivados en los medios sin sorbitol regeneraron brotes normales, aunque con baja frecuencia. Los explantes de las variedades Sainero, Barretero y Cor P4 únicamente regeneraron brotes al cultivarlos durante 5 días en el medio C1 con sorbitol, únicamente. El número máximo de brotes por explante se observó en los medios sin sorbitol (1.9 brotes) y el porcentaje más alto de explantes que formaron brotes fue de 4.0.

Cuadro 9. Tratamientos en los que se formaron brotes adventicios.

| Variedades | Medio de inducción | Medio de regeneración | Número de brotes por explantes (Días en sorbitol) |     | Explantes que formaron brotes (%) (Días en sorbitol) |     |
|------------|--------------------|-----------------------|---|-----|--|-----|
|            |                    |                       | 0   | 5   | 0  | 5   |
| CEZAC      | <b>C1</b>          | R6                    | 1.1   | 0.0 | 2.0  | 0.0 |
|            | <b>C2</b>          | R5                    | 1.2   | 0.0 | 2.0  | 0.0 |
| SAINERO    | <b>C1</b>          | R5                    | 0.9   | 0.7 | 2.0  | 2.0 |
|            |                    | R6                    | 1.9   | 1.7 | 3.0  | 4.0 |
|            | <b>C4</b>          | R7                    | 0.8   | 0.0 | 2.0  | 0.0 |
| BARRETERO  | <b>C1</b>          | R5                    | 1.1   | 0.9 | 2.0  | 3.0 |
|            | <b>C2</b>          | R7                    | 1.2   | 0.0 | 2.0  | 0.0 |
|            |                    | R8                    | 1.0   | 0.0 | 2.0  | 0.0 |
| COR P4     | <b>C1</b>          | R6                    | 0.9   | 0.7 | 2.0  | 2.0 |
|            | <b>C4</b>          | R7                    | 1.9   | 0.0 | 3.0  | 0.0 |
| JAS P4     | <b>C1</b>          | R6                    | 1.1   | 0.0 | 2.0  | 0.0 |

Swedlund y Locy (1993) indican que el sorbitol causa estrés osmótico y con ello las características morfogénicas y la capacidad regenerativa de las células cambian. Jain *et al.* (1997) mencionan que el estrés osmótico interrumpe las conexiones plasmodésmicas entre las células proembriogénicas, haciéndolas fisiológicamente aptas e induciéndolas a la diferenciación celular y a la embriogénesis somática. Asimismo, Cabrera-Ponce *et al.* (2014) observaron que los callos de frijol que sobrevivieron al estrés osmótico adquirieron la capacidad para generar embriones. El hecho de no haber observado un efecto positivo del sorbitol en la capacidad de regeneración de los callos de ajo en el presente trabajo, pudo deberse a que la dosis o tiempo de exposición sobrepasaron o estuvieron por debajo de lo que necesitaban las células para adquirir competencia para formar brotes adventicios.

Por otra parte, aun cuando en este experimento se redujo el tiempo de cultivo de los explantes en los medios de inducción se observaron brotes adventicios

anormales en varios de los tratamientos, así como masas celulares compactas, raíces y brotes vitrificados (Figura 16). Esta respuesta, probablemente se debió a que la concentración de los reguladores de crecimiento usada en los medios de inducción y/o regeneración causó un desbalance hormonal endógeno en las células de los explantes, el cual se tradujo en la formación de las estructuras antes descritas. Raven *et al.* (1992) mencionan que los reguladores de crecimiento son sustancias que en pequeñas dosis pueden provocar una respuesta fisiológica. Asimismo, Novak *et al.* (1986) observó que la capacidad morfogenética de ajo está fuertemente ligada a la duración de la fase de callo, especialmente si el medio de inducción del mismo contiene 2,4-D.



Figura 16. Estructuras formadas en los callos cultivados en los diferentes medios de regeneración. a) brotes adventicios anormales, b) masas celulares muy compactas con brotes y raíces, c) brotes adventicios vitrificados.

## 5.4 Experimento 2.

### 5.4.1 Inducción de los callos morfogenéticos

Los resultados obtenidos mostraron que todos los explantes de las cinco variedades de ajo estudiadas que se cultivaron en el medio C1 ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  BAP) formaron callo después de dos semanas. Cuando los explantes se transfirieron a un medio con  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (medio C5), la cantidad de callo incrementó cuatro veces a las 4 semanas; dicho callo era friable y de color amarillo claro. Asimismo, cuando los callos se subcultivaron en los medios C6 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$

2,4-D; 0.5 mg L<sup>-1</sup> cinetina) y C7 (1.0 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.0 mg L<sup>-1</sup> cinetina) continuaron aumentando su biomasa pero más lentamente y mantenían su consistencia friable.

#### **5.4.2 Regeneración de brotes adventicios**

Dos semanas después de que los callos provenientes de los medios C6 y C7 se transfirieron al medio de regeneración R5 (2 mg L<sup>-1</sup> BAP), fue posible observar grupos de células verdes en su superficie a partir de los cuales se comenzaron a formar los brotes adventicios (Figura 17).

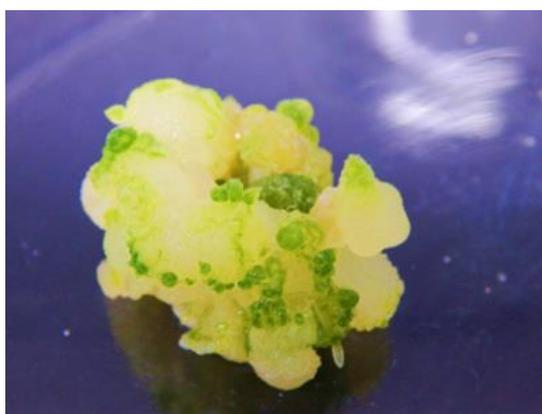


Figura 17. Callos cultivados en el medio R5 que formaron zonas de crecimiento verdes.

#### **5.4.3 Porcentaje de explantes que formaron brotes adventicios**

##### **5.4.3.1 Efecto del genotipo**

Sólo se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de explantes que formaron brotes entre las variedades CEZAC, Cor P4 y Jas P4 (100%) con respecto a la variedad Sainero (72%) (Figura 18). El alto porcentaje de explantes que formaron brotes observado en las variedades CEZAC, Cor P4 y Jas P4 podría estar relacionado con la influencia que tiene genotipo en la respuesta *in vitro* que ya se ha observado en otros trabajos (López-Gómez *et al.*, 2010). Asimismo, la condición inicial del material vegetal, pudo haber influido en la respuesta, ya que los dientes

de las variedades CEZAC, Cor P4 y Jas P4 eran de mayor tamaño y de mejor calidad que los de las variedades Sainero y Barretero.

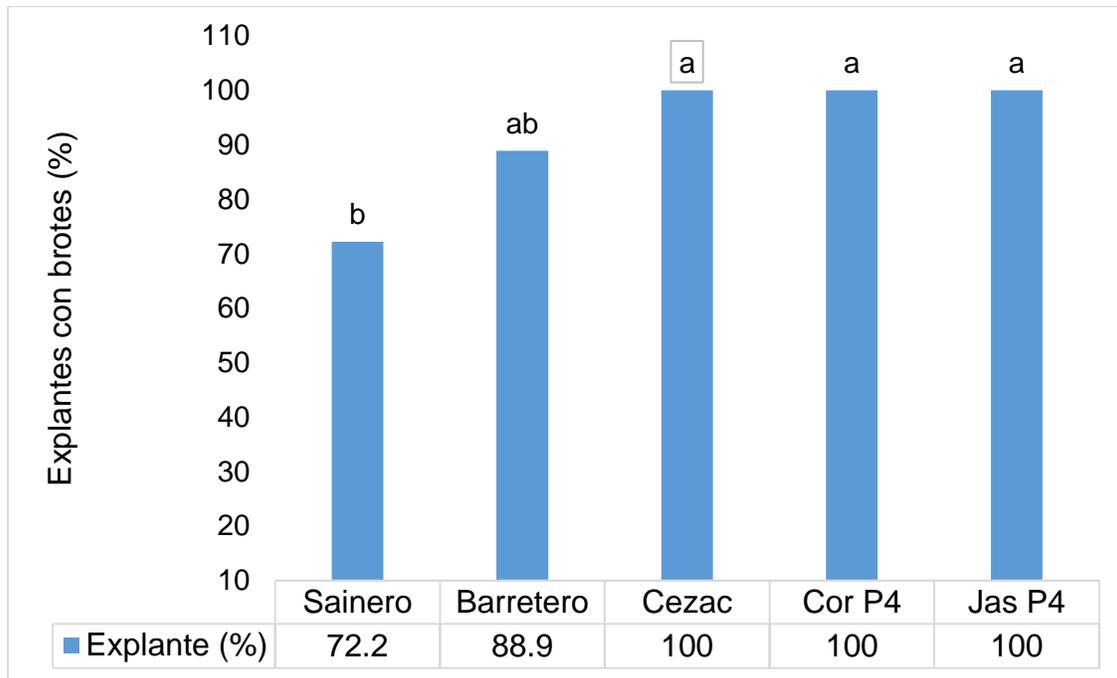


Figura 18. Porcentaje de explantes (callos) de cinco variedades de ajo que regeneraron brotes adventicios.

#### 5.4.3.2 Efecto del medio de cultivo

Fue posible observar alto porcentaje de explantes que formaron brotes tanto de aquellos que provenían del medio de inducción C6 como del C7, una vez que se transfirieron al medio de inducción R5 (2 mg L<sup>-1</sup> de BAP); de hecho no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos (Figura 19). Esto indica que, la combinación de los medios de inducción con el medio de regeneración empleado logró inducir la células de la mayor parte de los explantes para que diferenciaron brotes adventicios.

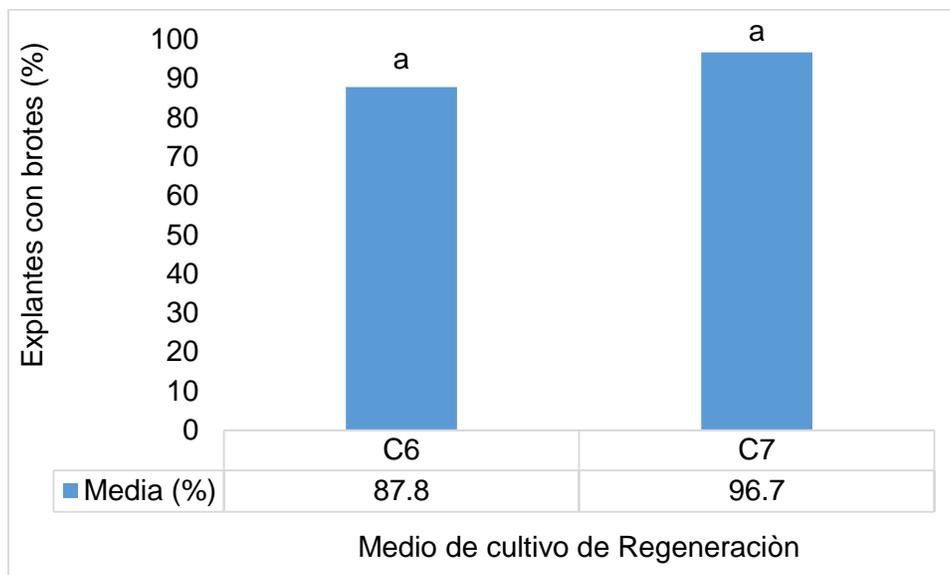


Figura 19. Porcentaje de explante (callos) de cinco variedades de ajo que formaron brotes adventicios.

Los resultados obtenidos contrastan con los de Robledo-Paz *et al.* (2000) quienes cultivaron ápices de raíz de las variedades ABEN y GT-1 de ajo en medios con la misma concentración de reguladores presente en los medios C6 y C7, y en el cual sólo 6 a 19% de los explantes lograron formar brotes adventicios. Asimismo, Quintana-Sierra *et al.* (2005) observaron que cultivar ápices de raíces de las variedades Cristal y Toro de cebolla (*Allium cepa*) en medios con una composición similar a la de los medios C6 y C7 promovió la formación de brotes adventicios en 21 a 50% de explantes. Cabe señalar, que tanto en el trabajo de Robledo-Paz *et al.* (2000) como el Quintana-Sierra *et al.* (2005), los explantes una vez que permanecieron en los medios de inducción, se cultivaron en ausencia de reguladores de crecimiento o  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, en tanto que en el presente trabajo los explantes se cultivaron en  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP.

#### 5.4.3.3 Efecto de la interacción genotipo y medio de cultivo (tratamientos)

Sólo los explantes de la variedad Sainero provenientes de los medios de inducción C7 ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  tanto de 2,4-D como de cinetina) mostraron menor capacidad para formar brotes adventicios que las otras combinaciones entre variedades y medios

de cultivo (Figura 20). De hecho cultivar los explantes de la variedad Sainero en el medio C6 (1.0 2,4-D, 1.0 indujo a más de 80% de éstos a formar brotes adventicios. Asimismo, fue posible observar que el medio de inducción indujo la formación de brotes en los explantes de las variedades CEZAC, Cor P4 y Jas P4 de manera tan eficiente como el medio C7. Lo anterior indica que cualquiera de los dos medios de inducción podría ser utilizado para promover la formación de brotes adventicios en las tres variedades antes mencionadas.

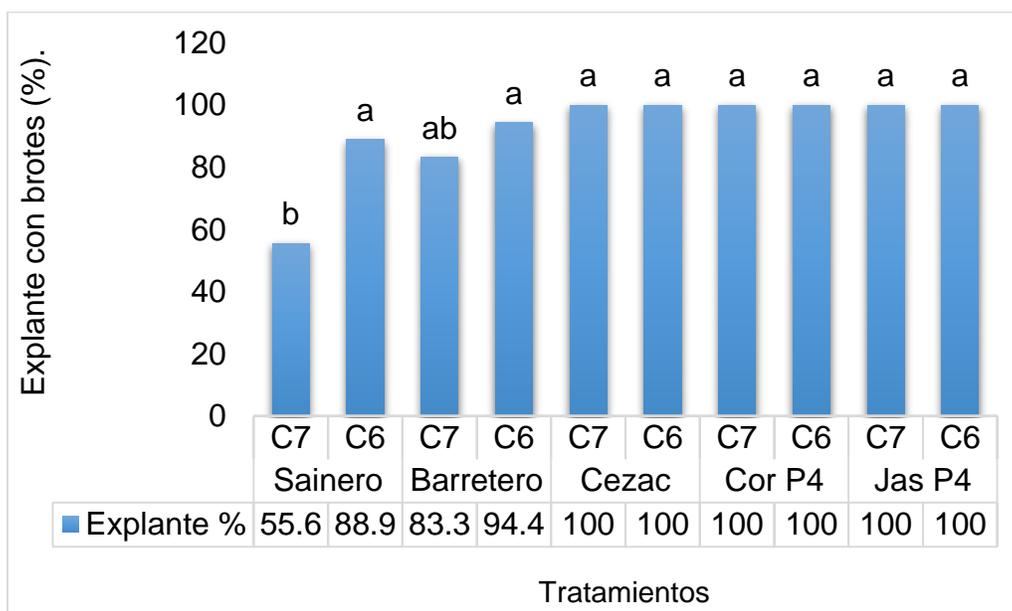


Figura 20. Efecto de la interacción del genotipo y medio de cultivo en el porcentaje de explantes (callos) que formaron brotes adventicios en cinco variedades de ajo.

#### 5.4.4 Número de brotes adventicios por gramo de callo

##### 5.4.4.1 Efecto del genotipo

El análisis de los resultados permitió observar que al igual que para el porcentaje de explantes que formaron brotes, para el número de brotes regenerados por gramo de peso fresco de callo, la respuesta de las variedades Cor P4, CEZAC y Jas P4 (18 a 24 brotes) fue significativamente mayor que para las variedades Sainero y Barretero (6 a 10 brotes) (Figuras 21 y 22). Los resultados anteriores indican que la

capacidad morfogénica estuvo en función del genotipo estudiado, tal como se ha observado en otros protocolos de regeneración de plantas de ajo (Zheng *et al.*, 1998, 1999; Barandiaran *et al.*, 1999b; Martín-Urdíroz *et al.*, 2004). Asimismo, el tamaño de los dientes de las variedades CEZAC, Jas P4 y Corp P4 fueron de mayor tamaño y más sanos que los de las variedades Barretero y Sainero, y esto pudo haber influido en su respuesta *in vitro*, ya que se sabe que en ajo el tamaño de los dientes está directamente correlacionado con el vigor del mismo. Al respecto, Reveles-Hernández *et al.*, (2009) mencionan que el tamaño de diente usado como semilla influye sobre su comportamiento en campo, ya que entre mayor sea su tamaño, su capacidad de almacenamiento de reservas será superior y tendrá mayor vigor durante las primeras etapas de crecimiento de la planta.

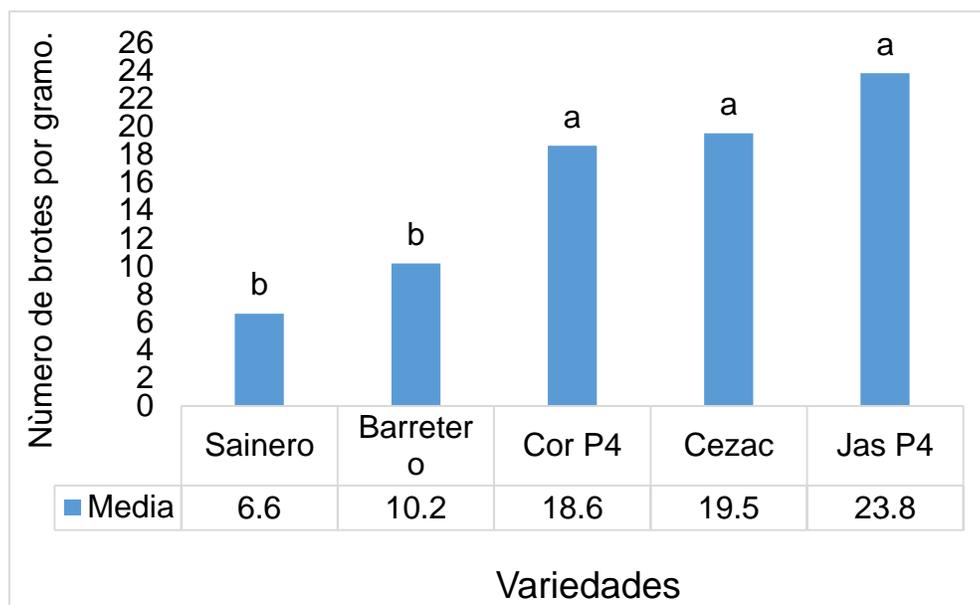


Figura 21. Efecto de la variedad en el número de brotes adventicios regenerados por gramo de callo de cinco variedades de ajo.

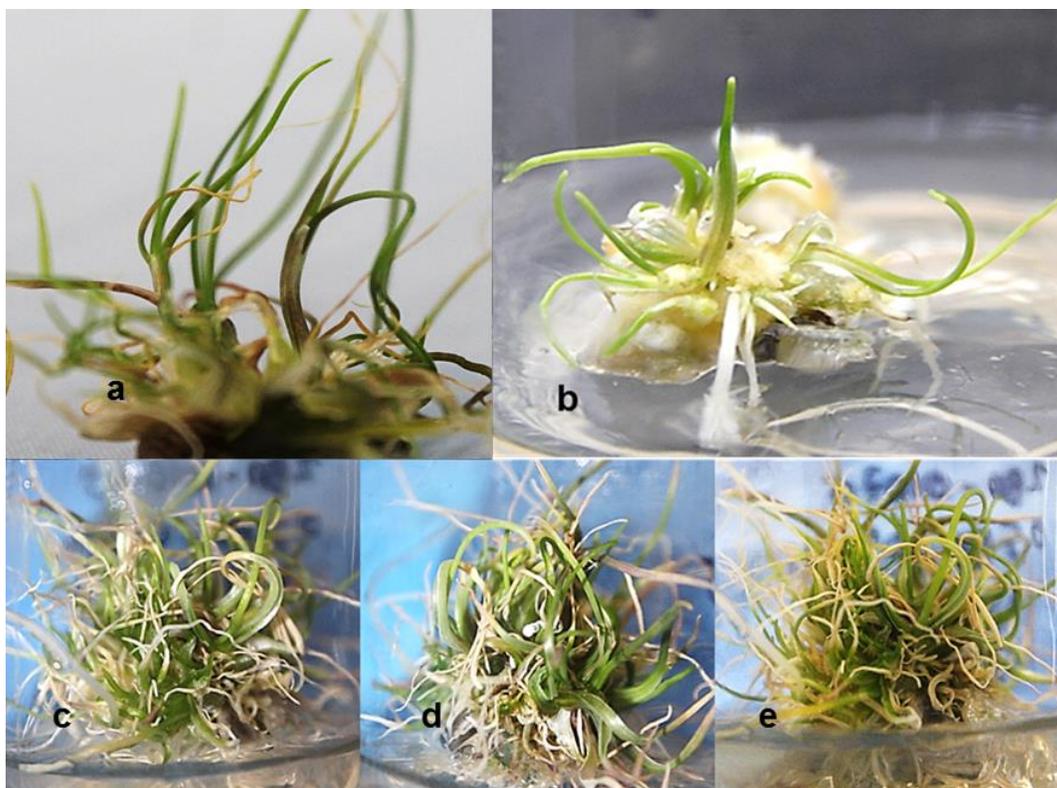


Figura 22. Brotes adventicios regenerados a partir de callo de las variedades Sainero (a), Barretero (b), CEZAC (c), Cor P4 (d), y Jas P4 (e).

#### 5.4.4.2 Efecto del medio de cultivo

No se encontraron diferencias significativas para el número de brotes adventicios por explante entre aquellos provenientes del medio C6 y los cultivados en el medio C7 (luego en el medio de regeneración R5, con  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP) (Figuras 23 y 24). Resultados similares fueron observados por Robledo-Paz *et al.* (2000) y Quintana-Sierra *et al.* (2005) al cultivar explantes de ajo (variedades ABEN y GT-1) y cebolla en medios con una composición similar a la de los medios C6 y C7. Lo anterior puede deberse a que la concentración de los reguladores de crecimiento presente en ellos no eran muy diferente.

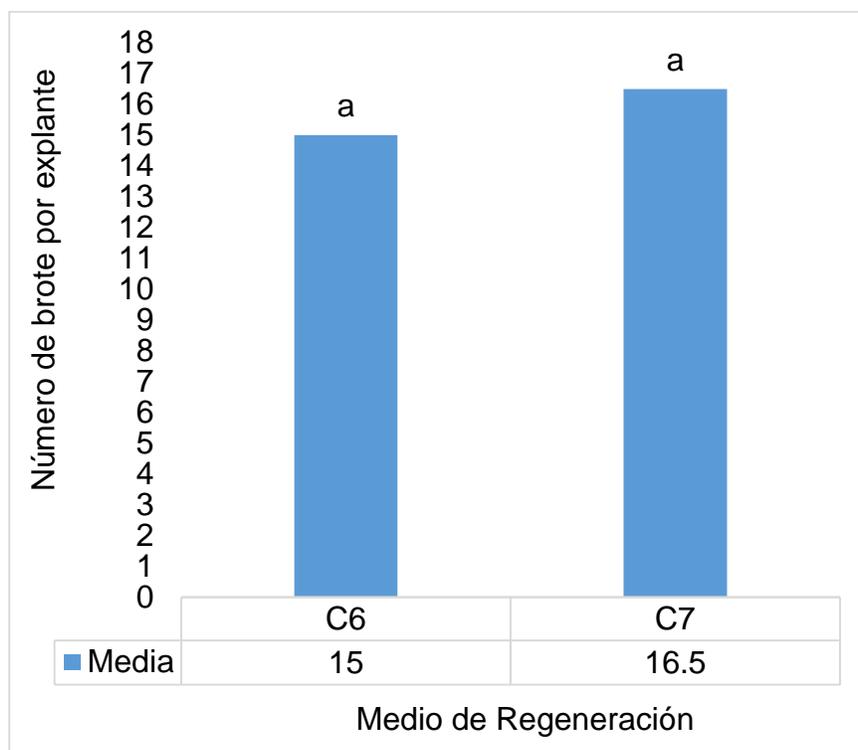


Figura 23. Efecto del medio de cultivo en el número de brotes adventicios regenerados a partir de ápices de raíz de cinco variedades de ajo. C6: 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina; C7: 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina.

Aun cuando Robledo-Paz *et al.* (2000) obtuvieron un número de brotes (por gramo de peso de callo) al cultivar la variedad ABEN de ajo en un medio con la misma concentración de reguladores de crecimiento que el medio C7 (0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina) (169 brotes), que el que se obtuvo en las variedades CEZAC, Cor P4, Jas P4; el porcentaje de explantes que formaron brotes estuvo muy por arriba (100%) de lo registrado para la variedad ABEN (19%). A partir de estos resultados podría inferirse que la eficiencia de regeneración de ambos protocolos es equiparable.

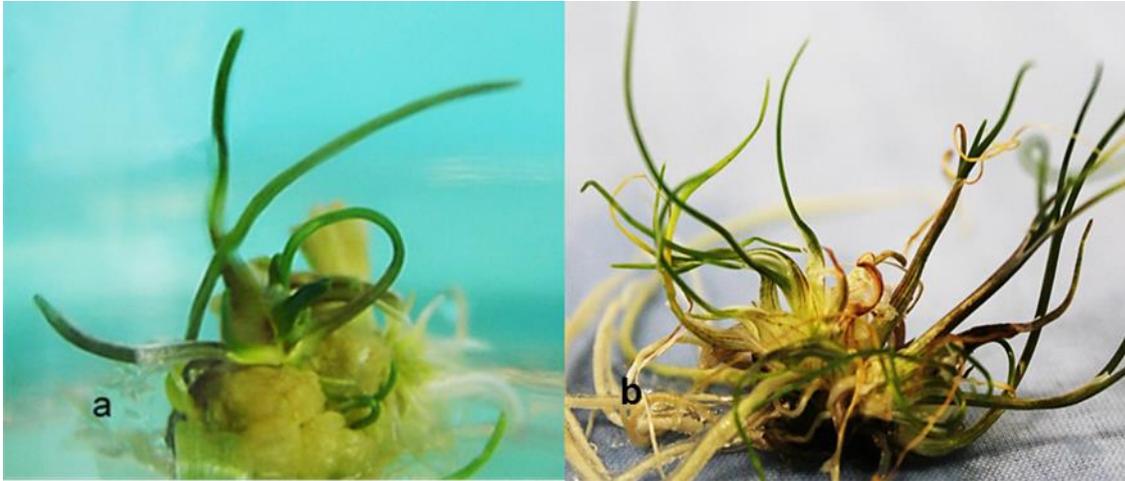


Figura 24. Callos regenerando brotes adventicios en los medios C6 ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D y cinetina) (a) y C7 ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  2,4-D y cinetina) (b).

#### **5.4.4.3 Efecto de la interacción genotipo y medio de cultivo (tratamientos)**

Fue posible observar que el número de brotes regenerados por los callos de la variedad Jas P4 provenientes de los medios C6 y C7, y los de la variedad CEZAC cultivados en el medio C7, fue significativamente superior al de aquellos de las variedades Sainero y Barretero cultivados tanto en el medio C6 como el C7 (Figura 25). Es decir, los callos de las variedades Cor P4, CEZAC y Jas P4 se comportaron de manera similar para esta variable al ser cultivados en los medios C6 y C7.

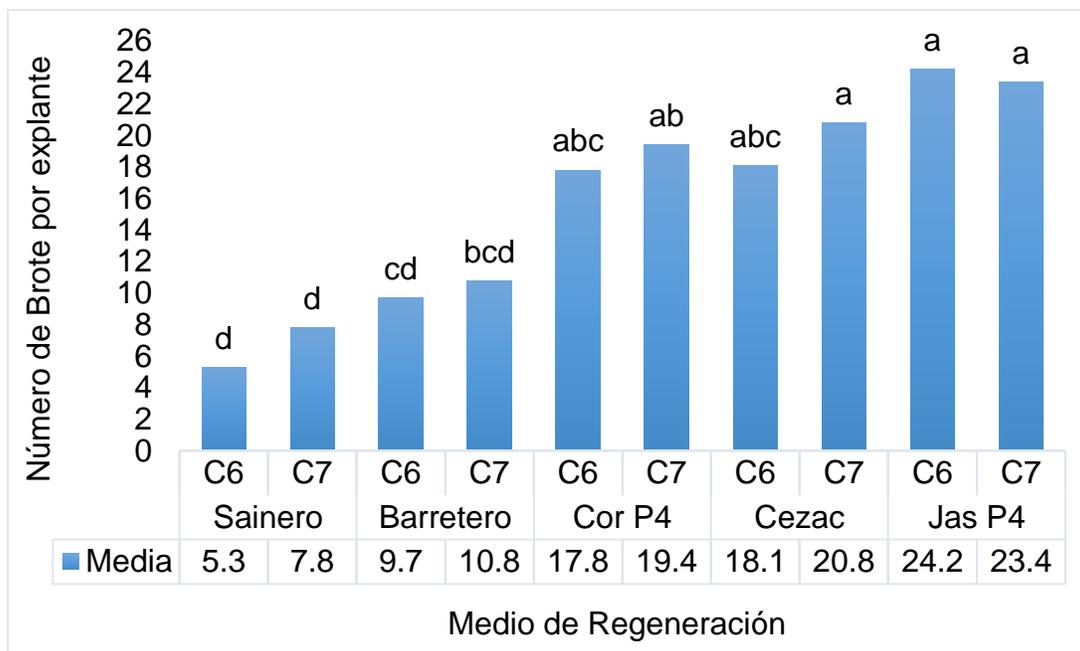


Figura 25. Efecto la interacción medio de cultivo y la variedad en la formación de brotes adventicios. C6: 1.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina; C7: 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y cinetina.

Dado que el número de brotes adventicios regenerados no fue significativamente diferente en los callos cultivados en el medio C6 y C7 para ninguna de las variedades de ajo estudiadas, es recomendable utilizar el medio C7 dado que su contenido de 2,4-D y cinetina es menor que en el C6, pudiendo reducirse con ello la frecuencia de plantas anormales.

#### 5.4.5 Bulbificación y aclimatación de las plantas regeneradas

Aun cuando los brotes adventicios formaron bulbos en un medio MS sin reguladores de crecimiento y con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, incrementar la concentración de sacarosa a 60 g L<sup>-1</sup> aceleró el proceso (Figura 26). Estos resultados están de acuerdo con los de Mujica y Mogollón (2004), quienes reportaron un aumento de bulbificación de ajo tipo morado al usar 6 % de sacarosa. Asimismo, Nagakubo *et al.* (1993) indujeron bulbificación en seis variedades de ajo (Isshuwase, Isshu-gokuwase, Shanhai, Santo, Furano y Howaito-Roppen), aumentando la concentración de sacarosa

desde 6 a 12 %. Yang *et al.* (1993) por su parte lograron inducir la formación de bulbos en la variedad Gigante Roxo al incluir 9% de sacarosa en el medio.

Una vez que las plantas mostraban microbulbos de 5 mm aproximadamente, se llevaron al invernadero. Después de 15 días de cultivo, las plantas se adaptaron a las dichas condiciones, una de las manifestaciones de adaptación fue la turgencia de sus hojas (aun sin la bolsa de plástico), el crecimiento de las mismas y la generación de nuevas hojas. Después de 30 días de que las plantas permanecieron en el invernadero, más del 80 % de éstas, permanecían vivas (Figura 27).



Figura 26. Microbulbos de la variedad CEZAC de ajo después de 15 días en el medio de cultivo con 6 % de sacarosa.



Figura 27. Plantas de cinco variedades de ajo, después de 45 días de transferirlas al invernadero.

Este trabajo se desarrolló un protocolo de regeneración de plantas de cinco variedades sobresalientes de ajo ampliamente cultivadas en el estado de Zacatecas, principal zona productora de este cultivo en nuestro país. Dicho protocolo permitirá entre otras cosas, incorporar la técnica de micropropagación a la producción de semilla-propágulo de calidad (genética y fitosanitaria) de estas variedades de ajo. Asimismo, el disponer de un protocolo de regeneración abre la posibilidad de realizar mejoramiento genético mediante ingeniería genética, para incorporar a este cultivo características como la resistencia o tolerancia a enfermedades como la pudrición blanca, la cual está presente en todas las zonas productoras de ajo en México y causa importantes pérdidas.

Por otro lado, aun cuando existen protocolos de propagación *in vitro* de distintas variedades de ajo (Robledo-Paz *et al.*, 2000; Pardo *et al.*, 2011; Scotton *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2014), hasta donde tenemos conocimiento, no hay trabajos enfocados a la micropropagación de las variedades estudiadas en la presente investigación, por lo que este es el primer trabajo al respecto.

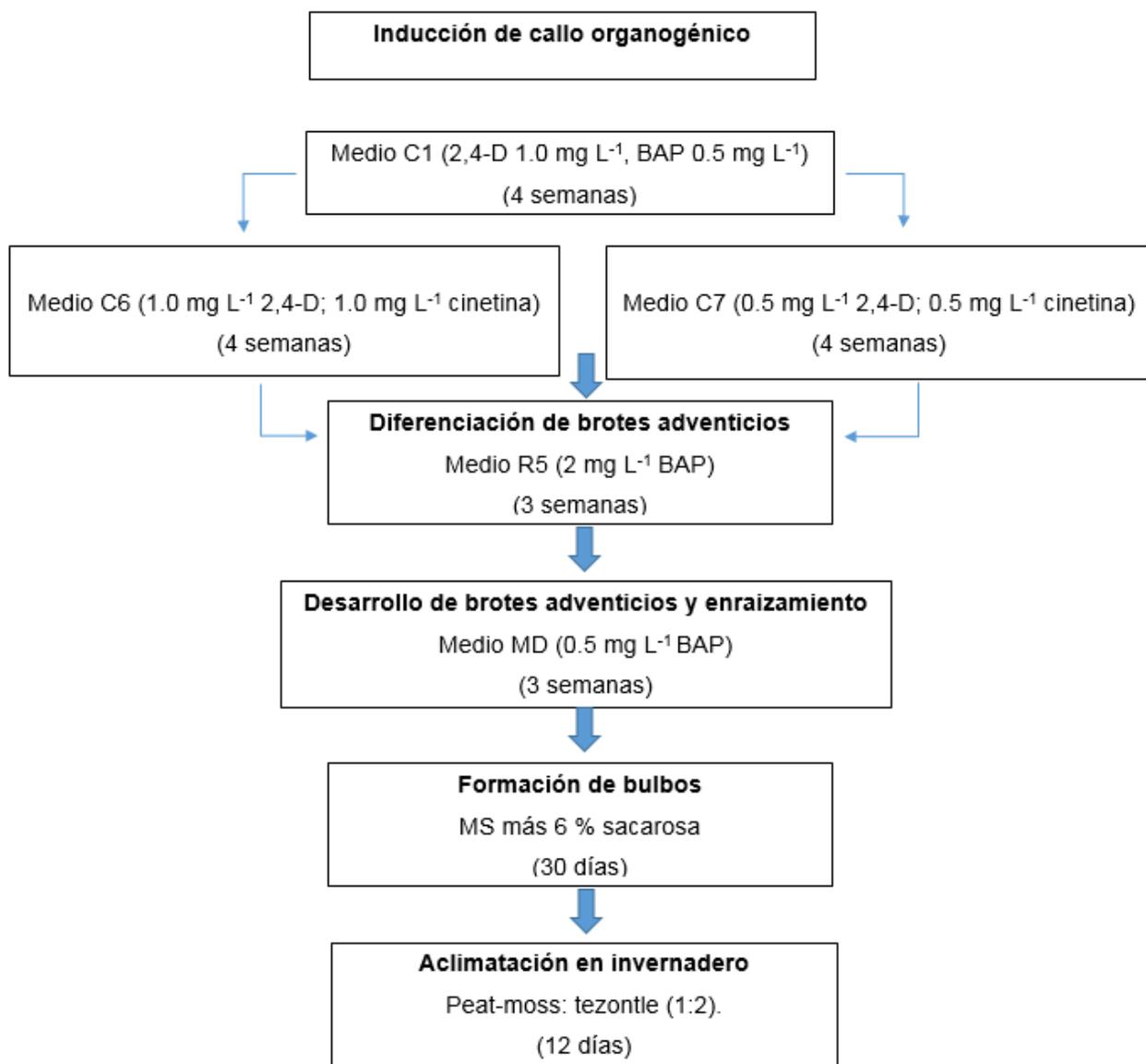


Figura 28. Protocolo para la regeneración de plantas de ajo (*Allium sativum* L.).

## VI. CONCLUSIONES

El establecimiento *in vitro* y la respuesta morfogénica estuvo en función del genotipo y la condición inicial del material vegetal; los genotipos CEZAC, JAs P4 y Cor P4 mostraron la mejor respuesta.

Es posible regenerar plantas de las variedades CEZAC, Cor P4, Jas P4, Barretero y Sainero siguiendo un protocolo en el cual la fase de inducción de callo morfogénico se lleve a cabo en medios que contengan 2,4-D y cinetina y BAP.

El sorbitol afectó negativamente la capacidad de los explantes para formar brotes adventicios.

El protocolo de micropropagación desarrollado puede ser utilizado para producir “semillas” de calidad y realizar ingeniería genética, para mejorar las características de las variedades en estudio.

## VII. LITERATURA CITADA

- Acosta-Rodríguez, G. F.; M. Lujan-Favela y R. Á. Parra-Quezada. 2008. Crecimiento y rendimiento de cultivares de ajo en Delicias, Chihuahua, México. *Agricultura Técnica en México*. 34: 177-188.
- Aguilar-Méndez, M. A., M, E, S Martin. F, M, A Aguilar. F, P Rodríguez. I, R Pedroza. G, G Rodríguez. G, J, A Díaz. 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata. Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*. Centro de Investigación en Ciencias Aplicadas y Tecnología Avanzada (IPN). Pp: 7-89.
- Ajo directo. 2006. Ajos. In <http://www.ajodirecto.com> consultado en línea el 17 de marzo de 2006.
- Al-Safadi B, Mir-Ali N, Arabi M. 2000. Improvement of garlic (*Allium sativum* L.) resistance to white rot and storability using gamma irradiation induced mutation. *J. Gen. Breed.* 54:175 - 181.
- Bachmann, J. 2001. Garlic: Organic Production. Disponible en: <http://www.eduinca.net/elibrary/en/book/download/id/7777> (consultado e línea el 11 de Mayo del 2016).
- Barak, M., Ettehad, G. H., Arab, R., Derakhshani, F., Habibzadeh, S. H., Mahommadnia, H., Dailami, P., Daryani, A., and Zarei, M. 2007. Evaluation of garlic extracts (*Allium sativum*) effect on common pathogenic gram-positive and gram-negative bacteria isolated from children with septicemia hospitalized at Imam Khomeini Hospital. *Research Journal of Biological Sciences* 2:236-238.
- Barandiaran X; Martín N; Rodríguez-Conde MF; Di Pietro A; Martín J. 1999a. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports* 18: 434-437.

- Boriss, H. 2006. Commodity Profile: Garlic. Agricultural Issues Center. Pittsboro, NC, USA. 10p.
- Burba J. L. 2008. The garlic varieties group (*Allium sativum* L.). Contribution for understanding. Horticultura Argentina 27(62): 20-27.
- Castro, C. J., R. Solanilla, W. A. Otero, C. A. Quintero, A. De la Rosa C. y W. Moosbugger. 1996. Productividad responsable en el campo. Bogotá Colombia, Proyecto Checua, CAR. 155p.
- Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) 2016. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4682&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Coley Smith J. R., King J. E. 1969. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. Ann. Appl. Biol. 64: 289-301.
- Coley Smith J. R., Mitchell C. M., Sansford C. E. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. Plant Pathology 39: 58-69.
- Couch B.C., Kohn L. M. 2000. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. Phytopathology 90: 514-521.
- Croci C, y Curzio, O. 1983. The influence of gamma irradiation on the storage life of red variety garlic. J. Food Proc. Preserv. 7(3):179 - 183.
- Crowe F. J. 1995. White rot. In: Compendium of onion and garlic diseases. H.F. Schwartz y S.K. Mohan (eds.). Minnesota. APS Press. pp. 14-16.
- Crowe F. J., Hall D. H. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. Phytopathology 70:74-78.

- Cho, K.; Park, J.; Osaka, T. Park, S. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta* 51: 956-960.
- Chupp C., Sherf A.F. 1960. *Vegetables diseases and their control*. New York. Ronald Press. pp. 393-394.
- Diniz, L.P., Maffia, L.A., Dhingra, O.D., Casali, V.W.D., Santos, R.H.S. & Mizubuti, E.S.G. 2006. Avaliação de produtos alternativos para controle da requeima do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 31:171-179.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1992. *Allium sativum* (Garlic). R.E.D. Facts. 3pp
- Esler G., Coley Smith J. R. 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology* 33: 13-22.
- FAO. 2009. Major food and agricultural commodities and producers. In: <http://www.faostat.fao.org> consultada en línea el 3 de febrero de 2009.
- Feng, Q. L. ; Wu, J. ; Chen, G. Q.; Cui, F. Z. ; Kim, T. N. Kim, J. O. A. 2000. Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52 (4): 662-668.
- Fritsch, R.M. and. Friesen, N. 2002. Evolution, Domestication and Taxonomy. In: Rabinowitch, H. D., Currah, L (Eds.). *Allium Crop Science: Recent Advances*, Gatersleben, Germany. pp: 5-30
- Galli F., Torres De Carvalho P. C., Tokeshi H., Balmer E., Kimati H., Nogueira C. O., Lima-Salgado C., Krugner T., Nogueira E., Filho A. B. 1980. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. Vol II. pp. 57-58.

- George E. F. and Sherrington P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd. Eversley UK. 709 pp.
- Gómez O Y Savón J. R. 1992 Estudio de parámetros genéticos en el ajo (*Allium sativum*). Agrotecnia de Cuba 24 (3-4):33-37
- Gómez O, Savón J. R, Espinosa J, Hernández T. 1991 Estudio de la variabilidad encontrada en clones de ajo en la provincia de La Habana. Agrotecnia de Cuba 23 (1-2): 1-4
- Haberlandt G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. S.B.Weisen Wien Mathnaturw 111: 69-92.
- Haque MS, Wada T, Hattori K. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. Plant Cell Tissue Organ Cult 50:83–89
- Hasan, M.M., Chowdhury, S.P., Alam S., Hossain, B. and Alam, M.S. 2005. Antifungal effects of plants extracts on seed-borne fungi on wheat seed regrading seed germination, seedling health and vigor index. Pakistan Journal of Biological Sciences 8:1224-1289.
- Hassan M, N. Haque M, S. Hassan M, M. Y Haque M. S 2014. An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tip as explant. J. Bangladesh Agril. Univ. 12(1):1-6.
- Heredia G., E. y Delgadillo S., F. 2000. El ajo en México, origen, mejoramiento genético, tecnología de producción. Libro Técnico Num. 3. INIFAP, Centro de Investigación Regional del Centro, Campo Experimental Bajío. México. 102p.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) 2002. Ajo argentino. Los varietales del INTA. Estación experimental Agropecuaria La Consulta. Documentos institucionales 081. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Aplicada.

- Jiménez E. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. En J. Pérez (Ed.), Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología (pp. 45-56). Cuba. Ediciones GEO.
- Kamenetsky, R. and Rabinowich, H. D. 2006. The Genus *Allium*: a developmental and horticultural analysis. Horticultural Reviews. 32:329-337
- Kemper, K. J. 2000. Garlic (*Allium sativum*). Longwood Herbal Task Force. 49 p. In: <http://www.longwoodherbal.org>. Consultada en línea el 12 de febrero de 2016.
- Kim, S. W.; Kim, K. S.; Lamsal, K.; Kim, Y.; Kim, S. B.; Jung, M.; Sim, S.; Kim, H.; Chang, S.; Kim, J. K.; Lee, Y. S. (2009). An *in vitro* study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19(8):760-4.
- Krikorian, A. (1991). Medios de cultivo: generalidades y preparación. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca, W., y Mroginski, L. (eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia. pp: 41-59.
- López-Gómez, P., L. Iracheta-Donjuan, M. Castellanos-Juárez, I. Méndez-López. A. Sandoval-Esquivez, J. F. Aguirre-Medina. M. C. Ojeda-Zacarías y A. Gutiérrez-Diez. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hoja de café. Revista Fitotecnia Mexicana 33: 204-2013.
- Lucas J.A. 1998. Plant pathology and plant pathogens. 3 ed. Berlin. Blackwell Science Ltd. p. 49.
- Lucier, G. and Biing-Hwan. L. 2000. Garlic, Flavor of Ages. Agricultural Outlook. Economic Research Service. USDA, 4p

- Mahlting B, Soltmann U, Haase H. 2013. Modification of algae with zinc, copper and silver ions for usage as natural composite for antibacterial applications. *Materials Science and Engineering* 33:79–983.
- Matijevic M, Bado S, Lagoda P, Foster B. 2013. Impact of induced mutations in plant breeding. *Plant Genetics and Breeding Technologies*. Monduzci. Vienna, Austria. pp: 45 - 47.
- Medero V, Padrón E, Rodríguez S, Gómez R, García M, López J, Ventura J, Martínez M, Álvarez M. 1997. Regeneración por embriogénesis somática en clones cubanos de yuca. *Agrotecnia de Cuba* 27 (1): 92-96.
- Metcalf D. A., Wilson C. R. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant Pathology* 48: 445-452.
- Monardes M, H. Aljaro U, A. Urbina Z, C. Martin B, A. Muñoz R, E. 2009. Manual De Cultivo Del Ajo (*Allium sativum* L.) y Cebolla (*Allium cepa* L.). Facultad de CS. Agronómicas universidad de Chile. Pp: 5-49
- Montes B. R., Cruz V.C., Martínez G.M., Sandoval G. G., García R.L., S. Zilch D., L. Bravo L., K. Bermúdez T., H. E. Flores M. y M Carvajal M. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18:125-131
- Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Tapia-Ramirez, J. Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346-2353
- Mujica, Henry, & Mogollón, Norca. (2004). Bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) Con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro* 16 (1): 55-60.
- Murashige T, Skoog F 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497

- Murashige T. 1974 Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- Nabulsi I, Al-Safadi B, Mir N, Arabi M. 2001. Evaluation of some garlic (*Allium sativum* L.) mutants resistant to white rot disease by RAPD analysis. *Ann. Appl. Biol.* 138(2):197-202.
- Nagakubo, T., A. Nagasawa y H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulbet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 175-183.
- Novák F.J. 1990. *Allium* tissue culture. En: Rabinowitch H.D. and Brewster J.-L (eds.). *Onion and allied crops. Vol. I.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp: 234-250.
- Olmos S. Luciani G, Galdeano E. 2010. Biotecnología y mejoramiento Vegetal II. Micropropagación. Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología, pp: 353-362.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2014. Estadísticas de producción del cultivo de ajo. URL: <http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/search/ajo/S>
- Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas División de Estadística (FAOSTAT). 2016. URL: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- Pal, S.; Tak, Y. K. Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (6): 1712-1720
- Pardo A, Hernández A, Méndez N, Alvarado G. 2015. Análisis genético, mediante marcadores RAPD, de microbulbos de ajo conservados e irradiados *in vitro*. *Bioagro* 27(3): 143-150.
- Pardo A., Luna F., Hernández N. 2011. In vitro regeneration of *Allium sativum* L., through leaf and root segments. *Bioagro* 23 (3): 207-214.

- Park EK, Kwon KB, Park KI, Park BH, Jhee EC. 2002. Role of Ca<sup>2+</sup> in diallyl disulfide-induced apoptotic cell death of HCT-15 cells. *Exp Mol Med* 34:250–257.
- Peña-Iglesias, A. 1988. El ajo: virosis, fisiopatías y selección clonal y sanitaria. I Parte teórico descriptiva. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 14:461-483.
- Petica, A.; Graviliu, S.; Lungu, M.; Buruntea, N. Panzaru C. (2008). Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering* 152: 22-27
- Phillips GC, Hubstenberger JF. 1995. Micropropagation by proliferation of axillary buds. In: Gamborg, Phillips (eds) *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 81-90.
- Pierik RLM 1987. *In vitro* culture of higher plants. Vol. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp: 183-230.
- Pinto C. M. F., Maffia L. A., Berger R. D., Mizubuti E. S. G., Casali V. W. D. 1998. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. *Plant Dis.* 82: 1142-1146.
- Piri I, Babayan M, Tavassoli A, Javahen M. 2011. The use of gamma irradiation in agriculture. *Afr. J. Microb. Res.* 5(32):5806 - 5811.
- Productos de Mendoza Argentina (ProMendoza). 2016. URL: [http://www.promendoza.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14&Itemid=20&lang=es](http://www.promendoza.com/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=20&lang=es)
- Quintana-Sierra, M. E., A. Robledo-Paz, A. Santacruz-Varela, M. A. Gutiérrez-Espinosa, G. Carrillo-Castañeda, J. L. Cabrera-Ponce. 2005. Regeneración *in vitro* de plantas de cebolla. *Agrociencia* 39: 647-655.
- Rabinowitch, H.D., and Brewster, J.L. (eds.). 1990. *Onion and Allied Crops*, pp. 192 205. Volume II. CRC Press. Inc., Florida. USA. 320 p.

- Radice S. 2010. Biotecnología y mejoramiento Vegetal II. Morfogénesis. Consejo Argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología, pp: 26-33.
- Rai, M. Yadav, A. Gade, A. 2008. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 27 (1), 76-83
- Ramos de S., G. 1991. El cultivo del ajo en el Estado Mérida. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Serie de paquetes tecnológicos. Maracay.
- Ramos, de S., G. 1988. Experiencias en la producción de semilla de ajo en Mucuchíes, estado de Mérida. FONAIAP DIVULGA No. 30. Venezuela. En: [www.ceniap.gov.ve](http://www.ceniap.gov.ve). Consultada en línea 20 de marzo de 2006.
- Rashid A (1988). *Cell physiology and genetics of higher plants*. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 67-103.
- Reddy M. S., Rahe J. E., Levesque C. A. 1992. Influence of onion seed bacterization on germination and *Mycosphere microflora* of *Sclerotium cepivorum* sclerotia. *Can. J. Microbiol.* 38: 1135- 1143.
- Reveles H., M. 2007a. Efecto de la fecha de siembra sobre el rendimiento y la calidad del ajo en Zacatecas. Memoria 2º Taller: Tecnología para el establecimiento del cultivo de ajo. Campo Experimental Zacatecas, INIFAP, Calera, Zac., México. pp:11-16.
- Reveles H., M. 2007b. Efecto de la posición de la semilla al momento de la siembra sobre el rendimiento y calidad en ajo en Zacatecas. Memoria 2º Taller: Tecnología para el establecimiento del cultivo de ajo, Campo Experimental Zacatecas, INIFAP, Calera, Zac., México. pp: 30-33.
- Reveles H., M. y R. Velásquez V. 2010. Sistema de producción de ajo en altas densidades y uso de la variedad CEZAC 06. In Salinas G., H.; U. Figueroa V.; J. Verastegui Ch.; A.F. Rumayor R.; A. Pajarito R.; H. M. Quiroga G.; A. Peña Ramos; A. Quiñones Ch.; G. A. Chávez R. (Eds.) Estrategias de

investigación para la innovación tecnológica: principales logros en el Norte-Centro de México. Libro Técnico. Núm. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Norte Centro. Matamoros Coah. Pp: 117-130

Reveles-Hernández M. y R. Velásquez-Valle, 2010a. Adopción y rendimiento comercial de ajo variedad CEZAC 06 en el estado de Zacatecas, México. In Vidal M., V. A.; B. Coutiño E.; R. E. Preciado O.; S. Montes H. (Editores), Memoria de resúmenes Congreso XXIII Nacional, III Internacional de Fitogenética. p 344.

Reveles-Hernández, M.; R. Velásquez-Valle y S. Rubio-Díaz. 2010b. CEZAC 06 variedad de ajo jaspeado para la región norte centro de México. In Vidal M., V. A.; B. Coutiño E.; R. E. Preciado O.; S. Montes H. (Editores), Memoria de resúmenes Congreso XXIII Nacional, III Internacional de Fitogenética. p 415.

Reveles-Hernández, M.; Velásquez-Valle, R. y Bravo- Lozano, A. G. 2009. Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. Libro Técnico No. 11. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP. 272 p.

Reveles-Hernández, M.; Velásquez-Valle, R. y Bravo-Lozano, A. G. 2009. Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. Libro Técnico No. 11. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP. 272 p.

Reveles-Hernández, M.; Velásquez-Valle, R. y Cid-Ríos J. A. 2014. Barretero, variedad de ajo jaspeado para Zacatecas. Folleto Técnico No. 61 Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP. Calera, Zacatecas, México. 32 p.

Robledo- Paz, A. Villalobos-Arámbula V M. Jofre-Garfias. A, E. 2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. In Vitro Cell Developmental Biology. Plant 36:416-419.

Rojas M. I. y Reveles H. M. 2013. Evaluación agronómica de variedades de ajo (*Allium sativum* L.) en Tlaxcala. Memoria VIII Reunión Nacional de Innovación

- Agrícola. Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 156 p.
- Romero C.S. 1993. Hongos fitopatógenos. L. Tress (ed.). Universidad Autónoma de Chapingo, Edo. de México. 342 p.
- Roselló O., J. 2003. Extractos naturales utilizados en agricultura ecológica. Disponible en: <http://agricultura-ecologica.servidor-alicante.com/imagen/documentos/fitosanitarios/extractos-naturales-utilizados-en-agricultura-ecologica.pdf>
- Sarita, V. 1995. Cultivo de ajo. Serie Cultivos. Fundación de Desarrollo Agropecuario (Eds) segunda edición. República Dominicana. 5: 24p.
- SAS (Statistical Analysis System). 2002. Software the SAS System for window version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC25513, USA.
- Scotton D, C. Benedito V, A. Molfetta J, B. Rodrigues B, I, FP. Tulmann N, A. Figueira A. 2013. Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. Horticultura Brasileira 31: 80-85.
- Servicio de información de alimentación y pesquera (SIAP) 2016. URL: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Situación Nacional e Internacional del Ajo en México (CONAJO). 2009. URL: <http://www.conajo.com.mx/situacion.html>.
- Somerville P.A., Hall D.H. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation and germination stimulants to reduce inoculum density. Plant Dis. 71: 229-233.
- Sondi, S. y Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 275: 177-182

- Stone H. E., Armentrout V. N. 1985. Production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum* during infection of onion. *Mycologia* 77(4): 526-530.
- Taner Y, y Kunter B. 2004. Determining effective radiation mutagen dose for garlic (*Allium sativum* L.). *Bahçe*. 33: 95 - 99.
- Thompson, M., Al-Qattan, K. K., Bordia, T., and Ali, M. 2006. Including garlic in the diet may help lower blood glucose, cholesterol, and triglycerides. *Journal of Nutrition*. (Supplement) 136:800S- 802S.
- Toro G, J y Briones V. J. 1995. Manejo de plantas-plagas en pastizales. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). 31: 3-129.
- Valle, G. P. 1989. Pudrición blanca del ajo, enfermedad que se extiende en Aguascalientes. Desplegable para Productores Núm. 12. SARH, INIFAP, CIFAP-Aguascalientes. Aguascalientes, México.
- Vargas-Aispuro, I.; C. Corrales-Maldonado, y M. A. Martínez-Téllez. 2008. compounds derived from garlic as bud induction agents in organic farming of table grape. *Chilean J. Agric. Res* 68: 94-101.
- Velásquez, V. R. 1992. Pudrición blanca del ajo; nueva enfermedad en Zacatecas. Folleto para Productores Núm. 14. Campo Experimental Zacatecas – INIFAP. Calera, Zac., Méx. 8 p.
- Velásquez, V. R. y Medina, A. M. M. 2004. Guía para conocer y manejar las enfermedades más comunes de la raíz del ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Folleto para Productores Núm. 34. Campo Experimental Pabellón, INIFAP. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 18 p.
- Velásquez, V. R. y Medina, A. M. M. 2007. Guía para identificar las enfermedades de la raíz del ajo en Aguascalientes y Zacatecas. Experimental Pabellón – INIFAP. Aguascalientes, México. p. 66 - 79.

- Velásquez, V. R., Medina, A. M. M. y Rubio, D. S. 2002. Guía para el manejo de la pudrición blanca del ajo en Zacatecas. Folleto Técnico No. 9. Campo Experimental Zacatecas – INIFAP. Calera, Zac., Méx. 20 p.
- Velásquez-Valle, R.; M. Reveles-Hernández y M. A. Velásquez-Valle. 2010a. Crecimiento de variedades de ajo en tres fechas de plantación en Aguascalientes, México. Memorias III Congreso Internacional de Fitogenética. Nuevo Vallarta, Nay., México. p 430
- Velásquez-Valle, R.; Reveles-Hernández, M. y Velásquez-Valle, M. A. 2010b. Pérdida de peso en bulbos de la variedad de ajo CEZAC 06 en almacenamiento. Memoria III Congreso Internacional de Fitogenética. Nuevo Vallarta, Nay., México.p 532.
- Villalobos, M., y Thorpe, A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Unidad de Recurso Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. pp: 127-141.
- Walker J. C. 1969. Plant Pathology. 3a. ed. Mc Graw-Hill. New York, p. 345-347.
- Weber G. F. 1973. Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics. Gainesville, University of Florida Press., USA. pp. 369-673
- Yamagishi, M. 1998. Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. Scientia Hort. 73: 239-247.
- Yan M, M. Xu C. Kim C, H. Um Y, C. Bah A, A. Guo de P. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of chinese jiaotou (*Allium chinense*). Scientia Horticulturae 123: 124–128.
- Yang, S. G., H. Lee, W. Jeong, S. Min y J. Liu. 1993. Production of virus-free microbulbs of garlic (*Allium sativum* L.) by *in vitro* culture of vegetative and floral buds in immature involucre. Journal Korean Society for Horticultural Scice 34 (3): 179-183.

Zepp G, Harwood J, and Somwaru A. 1996. Garlic: An Economic Assessment of the Feasibility of Providing Multiple-Peril Crop Insurance. Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture for the Office of Risk Management. California Condado de Maricopa, Arizona. 48p.

Zheng S, Henken B, Sofiari E, Jacobsen E, Krens FA, Kik C (1998) Factors influence induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. Plant Cell Tissue Organ Cult 53:99–105.

Zheng S, Kamenetsky R, Féreol L, Barandiaran X, Rabinowitch D. 2007. Garlic breeding system innovations. Med. Aromatic Plant Sci. Bio-techn. 1(1):6 - 15.