

Obtención de semilla de ajo

mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas

Resumen

El ajo (*Allium sativum* L.), es una especie hortícola de gran importancia en Cuba por su alta demanda por la población tanto con fines culinarios como medicinales. Es una especie estrictamente agámica, está afectada por diferentes enfermedades fungosas, bacterianas y principalmente virales, por lo que el mejoramiento tradicional está muy limitado y hay que acudir a las técnicas biotecnológicas para la obtención de semilla de alta calidad fitosanitaria. Teniendo en cuenta lo antes expuesto se desarrolló este trabajo en la División de Biotecnología, Fisiología y Resistencia del Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova” de Cuba, con el objetivo de informar algunos de los resultados alcanzados en Cuba y en el mundo relacionados con la tecnología del cultivo, los principales virus que lo afectan y la importancia del empleo de técnicas de cultivo de tejidos como técnica auxiliar al mejoramiento genético para aumentar los rendimientos y calidad de la semilla que se obtenga por esta vía.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.), figura entre las plantas que más antiguamente se consume por el hombre con fines culinarios o medicinales (Kotlinska *et al.*, 1990; Koch, 1993; Cabrera y Elliot, 1996). En el mundo se cultivan 813 000 ha. con una producción de 7.9 millones de toneladas y un rendimiento de 9.7 t/ha. (FAO, 1995).

Esta especie es de gran importancia económica para nuestro país, ya que su demanda por la población crece cada día más; sin embargo, debido a las dificultades que se confrontan con su cultivo se realizan numerosos esfuerzos para obtener nuevos genotipos mejores adaptados a nuestras condiciones climáticas y que garanticen rendimientos superiores a las 2 t/ha. (Savón y Marrero, 1997).

El mejoramiento genético por métodos tradicionales es muy difícil, ya que es una especie de reproducción asexual y estricta apomixia, por lo que la única vía de propagación es mediante los bulbillos o dientes que se forman anualmente en el bulbo (FAO, 1991); cada año se siembran dientes provenientes de bulbos cosechados el año anterior para obtener nue-

vas cosechas. En estas condiciones las enfermedades se transmiten más fácilmente a la descendencia, lo que provoca un debilitamiento progresivo e irreversible de las variedades. Son varios los problemas fitosanitarios involucrados capaces de causar pérdidas del 50 % o más del rendimiento, ya sea por la presencia de nemátodos, enfermedades fungosas y bacterianas, así como virales, que son las que más influyen en el deterioro del cultivo (Abiko *et al.*, 1980; Messiaen, 1993), siendo el virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV), el virus del estriado amarillo del puerro (LYSV) y el virus latente del chalote (SLV) los más frecuentes y el primero el más difícil de erradicar (Peña-Iglesias y Ayuso, 1983; Hernández *et al.*, 1995). Es aquí donde el empleo de las técnicas biotecnológicas cobran su real dimensión.

La Biotecnología Vegetal es una rama de la Biología que se está expandiendo rápidamente porque es producto de varias disciplinas que, hasta hace relativamente poco tiempo, se consideraban independientes: la Biología Molecular, el cultivo de tejidos, la Ingeniería Genética y la Patología Vegetal; abarca una serie de técnicas, entre las que se encuentra el cultivo de células y tejidos *in vitro*, que se ha convertido en una valiosa herramienta en el mejoramiento genético de especies de importancia económica (Lindsey, 1992; Jiménez, 1998 b).

De gran importancia para el ajo, es el desarrollo y la aplicación de la biotecnología, que permite establecer un programa de saneamiento, que tiene como objetivo la obtención de plantas libres de patógenos y la posterior propagación *in vitro* de las mismas para aumentar el número de individuos a partir de un explante inicial.

La micropropagación de plantas es sin dudas la más popular de las aplicaciones del cultivo *in vitro*, sus bases se establecieron desde los años 50 y 60, pero no fue hasta la década del 70, en que se estableció una verdadera industria (Kitto, 1997). Esta técnica, ha trascendido de forma exitosa de los experimentos a nivel de laboratorio a la aplicación práctica, es muy valiosa en plantas con una producción pobre de propágulos, así como una propagación vegetativa insuficiente (Jiménez, 1998 b; Orellana, 1998 b).

Para el desarrollo exitoso de esta técnica se debe ser muy estricto en el cumplimiento de cada fase, desde la preparación del explante hasta la aclimatización de las vitroplantas (Agramonte *et al.*, 1998; Orellana, 1998 b).

Los métodos biotecnológicos han sido aplicados al ajo en diferentes países, con el objetivo de obtener y caracterizar genotipos mejorados y de proveer una técnica de propagación vegetativa que facilite el mantenimiento de materiales de interés (Conci y Nome, 1991; Luciani *et al.*, 1998 a). Sin embargo, los resultados que se han alcanzado no siempre son extrapolables, lo que puede deberse a diferencias en cuanto a las características genéticas y fisiológicas de los clones o variedades que se cultivan y a su adaptación a otras condiciones ecológicas.

El ajo, aunque es una planta anual, presenta la limitante de que sólo se reproduce de forma asexual, por lo que la aplicación de estas técnicas sería de gran importancia para su cultivo en Cuba, ya que está muy reducido o no se cuenta con clones o variedades de alta calidad biológica para iniciar su propagación *in vitro* y la posterior adaptación de los microbulbillos que se obtienen en el laboratorio, que constituyen la semilla prebásica.

Debido a la alta demanda que tiene el ajo por la población, es necesario profundizar en las investigaciones que se han realizado y para ello se ha desarrollado el siguiente trabajo con el objetivo de informar algunos resultados obtenidos en este cultivo en Cuba y el mundo relacionados con su tecnología de cultivo, los virus que lo afectan y con mayor profundidad la importancia del empleo de técnicas biotecnológicas para aumentar el rendimiento y la calidad de la semilla.

El cultivo del ajo

Origen y distribución

El ajo, fue domesticado por el hombre para ser usado primero como condimento y luego como planta medicinal. Su centro de origen es Asia Central (Kazajistán, Uzbekistán y Turmenistán) y se ha encontrado silvestre en las montañas Altaicas de Siberia y en la parte sur del macizo de los Urales, cerca de donde se une el Volga con el Mar Caspio, de donde se expandió hacia Egipto y China (McCollum, 1976; Cabrera y Elliot, 1996). Se introdujo en América por los conquistadores españoles probablemente a través de México, desde don-

de fue diseminado hasta Chile por el Sur y posteriormente fue introducido en el hemisferio Norte, donde constituye en la actualidad un cultivo de importancia económica (FAO, 1988).

El nombre romano del ajo es *Allium* y *sativum* proviene del latín y quiere decir cultivado (Cabrera y Elliot, 1996). Es una especie que depende de las condiciones termofotoinductoras y se encuentra distribuida desde el Ecuador hasta los 40°LS y desde el nivel del mar hasta los 3 700 m.s.n.m., lo que demuestra su amplia capacidad de adaptación (Burba, 1992).

Taxonomía y relaciones filogenéticas

Allium, es un género muy diverso de la familia Alliaceae, entre las especies más populares y domesticadas están la cebolla (*Allium cepa*), el chalote (*Allium ascalonium*), el puerro (*Allium porrum*) y el ajo (*Allium sativum*), todos con $x=8$ cromosomas (Traub, 1968).

No se conocen formas silvestres, sino sólo cultivadas, siendo *Allium longicuspis* su probable ancestro. La domesticación del ajo desarrolló un camino diferente al de la cebolla y el puerro, que poseen grandes cantidades de semillas para su propagación; éste, en cambio se propaga exclusivamente por bulbillos o dientes (Koul y Gohil, 1970). Algunos genotipos forman flores entremezcladas con bulbillos, pero nunca producen semillas viables, aunque Etoh (1983), reporta la germinación de semillas provenientes de la floración *in vitro* de algunos materiales.

Esta hortaliza presenta una interesante variabilidad en materiales cultivados en el mundo, diferenciándose en madurez, dormancia, requerimientos de frío, tamaño del bulbo y número de bulbillos, color de la hoja protectora, facilidad de emitir vara floral, entre otras (Burba y Blanco, 1986). No se conoce cuánta variabilidad fue seleccionada cuando *Allium sativum* o su ancestro todavía se multiplicaba sexualmente o cuánto ha surgido por mutaciones en las yemas luego de que se convirtiera en una planta exclusivamente agámica y estéril. El presunto ancestro, *Allium longicuspis*, es también de reproducción asexual y no tiene semillas viables.

Principales características botánicas

El ajo es una planta anual de reproducción vegetativa, que al finalizar su ciclo de vida muere, quedando con vida las yemas que se forman en los dientes, mediante las cuales realiza su reproducción. Su sistema ra-

dical es de tipo barba, muy parecido al de la cebolla; las raíces son adventicias y crecen del tallo verdadero, alcanzan una profundidad de 5-45 cm (Cuba. MINAG, 1983).

El tallo es compuesto, presenta túnicas exteriores e interiores, disco o plato, tallo verdadero de la planta madre y dientes. El tallo verdadero es muy corto, se encuentra en la base de la planta y muere totalmente al final del ciclo vegetativo. Las hojas se forman después de terminado el estado de reposo de los dientes y constan de limbo y vaina en forma de canal (Cuba. MINAG, 1983).

El bulbo es el órgano donde se acumulan las sustancias nutritivas; las túnicas externas envuelven el bulbo entero y las internas a los dientes, estos últimos se componen de: túnica apergaminada, túnica carnosa, yema y tallo verdadero. Los dientes en el bulbo pueden ser simples o compuestos; los simples tienen una sola yema y los compuestos dos o más y su número en el bulbo o cabeza depende de la variedad, en el ajo 'Criollo' oscila entre 15-30, pero el 'Vietnamita' sólo tiene ocho o nueve. El proceso de acumulación de sustancias nutritivas se intensifica después que cesa la formación de las yemas y el crecimiento intenso de las hojas (Cuba. MINAG, 1983; Giaconi, 1993).

Requerimientos del cultivo

Este cultivo requiere clima fresco a frío durante el desarrollo inicial y caluroso y luminoso desde que comienza a formarse el bulbo hasta la cosecha. Cuando la planta no ha estado sujeta a bajas temperaturas, esto puede traducirse en que el bulbo no se forme, aun cuando los días sean largos; con temperaturas medias diarias muy próximas o por debajo de los 21°C durante 40 días se obtienen los mejores rendimientos, pero cuando el descenso de las mismas ocurre durante los primeros 30 días de la plantación o 70 días después de la siembra los rendimientos disminuyen considerablemente (Cuba. MINAG, 1983; Savón *et al.*, 1987; Giaconi, 1993).

Las mejores fechas de plantación están entre el 21 de octubre y el 21 de noviembre; requiere para su cultivo suelos profundos y fértiles, de consistencia media, permeables, con una proporción equilibrada de Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K). Los riegos tienen gran importancia, ya que interactúan con otros factores, tales como los bioclimáticos y la ferti-

lización, por lo que para lograr un crecimiento satisfactorio y una producción aceptable es conveniente mantener el suelo prácticamente a capacidad de campo durante todo el período (Savón *et al.*, 1987; León, 1991; Giaconi, 1993).

La madurez se conoce por el cambio de color de las hojas y el falso tallo, existiendo diversos criterios, ya sea la presencia de sólo dos o tres hojas nuevas verdes, o la flexión de la planta para realizar la cosecha del cultivo. Cuando se trata de ajo para semilla, y siempre que las condiciones lo permitan, la cosecha deberá efectuarse a madurez plena, es decir, cuando la planta no sólo se pone amarilla sino que se seca, garantizando el traslado de todos los productos de síntesis al bulbo (Burba, 1992; Giaconi, 1993). El curado es la etapa posterior, que consiste en someter a los bulbos a temperaturas entre 25-30°C de cuatro a siete días al sol y humedad relativa entre 60-70 % (Burba, 1992; Engeland, 1996). Posteriormente los bulbos se almacenan en lugares ventilados y en mazos (Cuba. MINAG, 1983). Salgado *et al.* (1997), encontraron una disminución de las pérdidas postcosecha en el ajo 'Hov-1' al aplicar *Biobras-6*.

Los rendimientos en este cultivo varían de acuerdo a la variedad, densidad de población y condiciones de cultivo, en nuestro país no superan las 3 t/ha (Cuba. MINAG, 1983) mientras que en California exceden las 20 toneladas, llegando a 22-24 t/ha. (Giaconi, 1993).

Importancia socioeconómica

El ajo se ha cultivado desde los tiempos prehistóricos y se ha extendido por todo el mundo, es un cultivo ampliamente utilizado como ingrediente fundamental en diversos alimentos, también fue popularizado como planta medicinal, recomendada y empleada contra distintas enfermedades, ya que se ha demostrado científicamente la acción bactericida de sus sustancias fitocidas presentes en sus aceites esenciales, los cuales matan o detienen el desarrollo de bacterias tuberculosas, tíficas, disentericas, diftericas, coléricas y muchas otras. Se usa como tratamiento preventivo contra la arterioesclerosis, catarro, asma, tuberculosis, trastornos del sistema digestivo, además previene los coágulos y disuelve el colesterol, es muy beneficioso para los varicoseles y las hemorroides. (Cuba. MINAG, 1983; Pai y Platt, 1995; Fellner *et al.*, 1996; Cabrera y Elliot, 1996).

Las áreas destinadas a la producción mundial ascienden a 1 075 000 ha con un rendimiento promedio de 11.07 t/ha. (Tabla 1).

Continente	Área (1 000 ha.)	Rendimiento (t/ha.)	Producción (1 000 t)
Africa	21	12.3	261
Asia	866	11.9	10 343
Europa	80	5.7	462
Norte y Centroamérica	26	12.7	329
Sur América	35	6.7	235
Mundo	1 075	11.07	11 905

TABLA 1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DEL AJO

Como se puede observar en la tabla anterior, el continente asiático es el de mayor producción, donde es muy común se sequen los dientes al sol y se almacenen en sobres de nylon, el sabor no es tan fuerte como el del ajo normal, pero es otra forma de conservarlo y consumirlo; en Chile tiene una alta demanda y constituye un producto de exportación, se deshidrata para obtener ajo en polvo y se elaboran extractos con diferentes propósitos (Giaconi, 1993; Cabrera y Elliot, 1996; FAO, 1999).

En Cuba, esta especie fue introducida desde principios del siglo pasado, se encuentra en algunas localidades de La Habana y en la actual provincia de Sancti Spiritus, cultivándose en todo el país, años más tarde; junto a la cebolla y el ají son los condimentos indispensables en casi todas las recetas (Savón y Marrero, 1997).

Gómez *et al.* (1991) y Gómez y Savón (1992), evaluaron la variabilidad genética existente en materiales provenientes de zonas productoras de ajo de la provincia La Habana, con el fin de aprovechar dicha variabilidad en posteriores programas de mejoramiento. El clon 'Vietnamita', introducido en Cuba en la década del 80 también ha sido estudiado y algunas de sus características son: bulbos de forma irregular con pocos dientes y ciclo de vida más corto que el de las variedades y clones 'Criollo' (Marrero y Savón, 1997; Fernández, 1999; Figueredo *et al.*, 1999).

A partir de los resultados que se obtuvieron se recomendó continuar trabajando con los clones 6; 3 y 9 junto con los clones 'Martínez' (4) y 'Vietnamita' (Anexo 1) para someterlos a saneamiento *in vitro* mediante cultivo de meristemas, ya que estaban infectados al menos con OYDV y en el país no había en ese momento material libre de virus para iniciar un programa de obtención de semilla mediante técnicas biotecnológicas (Gómez y Savón, 1992).

El ajo, es rico en sustancias nutritivas, las plantas verdes contienen: 7.5-10 % de sólidos; 1-2.5 % de azúcares; 1.6-2.1 % de proteínas crudas; 1.4-2.2 % de celulosa; 0.7-0.8 de cenizas y 22-23 mg % de vitamina C. Los bulbos maduros contienen: 36-40 % de sólidos; 1.5-1.8 % de cenizas; 15.6-20.5 mg % de vitamina C y 0.06-0.19 % de aceites esenciales. De la cantidad de aceites esenciales depende el gusto picante y su acción bactericida (Cuba. MINAG, 1983). Según Rodríguez *et al.* (1998), la mayor acumulación de materia seca tiene lugar en los bulbillos o dientes, seguida por las hojas y Giménez *et al.* (1998), informan que la materia seca en el genotipo de ajo 'Colorado' proveniente de la zona centro-norte de Mendoza (Argentina) osciló entre 36.32-37.54 % para las diferentes fechas de observación y entre 35.46-37.65 % para las condiciones de conservación que se ensayaron.

Problemática del cultivo

Las principales dificultades que presenta esta especie son: su reproducción asexual; la afectación de diferentes plagas y enfermedades que provocan grandes pérdidas en su rendimiento; y la imposibilidad de formar híbridos sexuales con especies afines (Burba, 1992; Van der Valk *et al.*, 1992; Giaconi, 1993). Por lo que el único método disponible es la selección y posterior multiplicación de los genotipos con caracteres distintivos (Burba, 1992; Pérez, 1998).

Entre las plagas y enfermedades que más afectan el cultivo se encuentran el nemátodo *Ditylenchus dipsaci* y los hongos *Penicillium corymbiferum*, *Alternaria porri* y *Sclerotium cepivorum* y los virus que pueden provocar pérdidas económicas en el rendimiento del 50 %, esto se debe a que la contaminación atribuida antiguamente a un solo virus, se produce por lo general por un complejo viral compuesto por lo menos por dos o más carlavirus y potyvirus, entre los que se encuentran: virus del mosaico del ajo (GMV), virus latente del ajo (GLV), virus del estriado amarillo del ajo (GYSV), virus latente del clavel (CLV), virus latente del chalote (SLV), virus del estriado amarillo del puerro (LYSV) y virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV). Este último es el más difícil de erradicar (Cuba. MINAG, 1983; Conci *et al.*, 1987; Van Dijk *et al.*, 1991; Burba, 1992; Engeland, 1996).

Las variedades no reaccionan frente al saneamiento y posterior propagación *in vitro* de la misma mane-

ra, pudiendo existir casos en que el material libre de virus no supera al enfermo crónico, situación ésta que podría explicarse por la tolerancia natural del genotipo (Walkey y Antill, 1989; Gómez, 1992; Hernández *et al.*, 1994).

Otro inconveniente en la adaptación de las vitroplantas provenientes del cultivo *in vitro* es la aparición de enfermedades. Herrera *et al.* (1994), informan que el damping-off o marchitez de las posturas, es una enfermedad que aparece en las plántulas de ajo expuestas a riego excesivo, a baja luminosidad y temperaturas. Una vez que estén dadas estas condiciones se presentan los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Phythium spp.*, la presencia del primero origina lesiones necróticas a nivel de la base del tallo, estrangulamiento, secado y muerte de la planta; y el segundo provoca una pudrición acuosa de color negruzco que abarca desde la base del tallo hasta las hojas, y causa igualmente la muerte de la planta.

Cultivo de tejidos

Antecedentes

Aun cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos, importantes antecedentes se remontan a los años 1838 y 1839, en que los biólogos alemanes Schleiden y Schwann, dejaban implícitamente el concepto de totipotencia de las células, a través de la Teoría Celular, la cual explicaba la complejidad de los organismos celulares sugiriendo que cada célula es una unidad independiente capaz de formar un organismo completo si se le pone en condiciones favorables (Krikorian y Berqueam, 1969 citados por Smith, 1992). Sachs en 1860 y Knops en 1861 citados por Litz y Jarret (1991) descubrieron que las sustancias más importantes que absorbían las plantas eran los compuestos orgánicos. El resultado de estas observaciones fue la elaboración de una sustancia nutritiva (solución Knops) que se emplea actualmente y que históricamente se usó como componente básico de los medios de cultivo.

Haberland, asimiló todos esos conceptos existentes en aquel momento y en 1902 discutió la posibilidad de demostrar que todas las células vegetales tienen la capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad (Pierik, 1990). Esta hipótesis no pudo ser demostrada hasta que White en 1934 citado por Villalobos (1990), comprobó que era factible culti-

var con éxito órganos vegetales, y utilizó para ello raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y Nobercourt en 1939 citado por Villalobos (1990), obtuvo raíces adventicias de un callo de zanahoria (*Daucus carota*). Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de la totipotencialidad celular.

Otros acontecimientos importantes fueron: el cultivo de ápices de dalia infectados con algún virus y la obtención de plantas sanas por Morel y Martín en 1952 citados por Navarro (1991); en 1958 y 1959, Steward y Reinert, respectivamente (citados por Christianson y Warnick, 1988), informaron la Embriogénesis Somática en la zanahoria; la hibridación interespecífica mediante la fusión de protoplastos entre dos especies de *Nicotiana* y la regeneración de híbridos (Carlson *et al.*, 1972) y más recientemente se han empleado técnicas de transformación genética de plantas, que han provocado un salto considerable en las dos últimas décadas, dado por la unión de los adelantos en la biología molecular y el cultivo *in vitro*, en la actualidad se ha demostrado la posibilidad de transformar células intactas mediante electroporación en caña de azúcar y café (Arencibia *et al.*, 1995 y Barbón, 1997).

Aplicaciones

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

Constituye dentro de la biotecnología, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones según diferentes autores (Pierik, 1990; Misawa, 1994; Vasil, 1994; Kitto, 1997; Jiménez, 1998 a) son:

- 1.- Saneamiento y micropropagación de plantas con interés económico y comercial.
- 2.- Mejoramiento genético.
- 3.- Conservación e intercambio de germoplasma.
- 4.- Obtención de haploides y líneas isogénicas
- 5.- Producción de metabolitos secundarios.
- 6.- Crioconservación
- 7.- Cultivo de células y protoplastos
- 8.- Semilla artificial.
- 9.- Ingeniería genética.

Es preciso señalar que el cultivo *in vitro* no es tan simple como a veces se expresa, como gran sistema en el que interactúan varios procesos; cometer errores o subestimar a cualquiera de ellos conlleva al fracaso del objetivo propuesto.

Factores a tener en cuenta para la micropropagación

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro*, se siguen una serie de principios básicos que no se pueden violar (Jiménez, 1998 b), estos son:

- **Selección del explante:**

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

- **Desinfección:**

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

Diversos compuestos químicos se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes, se emplean con mayor frecuencia el etanol (70 % v/v) y el hipoclorito de sodio (1-3 %) y con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio (6-12 %) y el bicloruro de mercurio (0.1-1.25 %), aunque con este compuesto por lo general se obtienen mejores resultados, es altamente tóxico y no se remueve con facilidad del explante. Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween 20 para reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante (Margara, 1988; Jiménez, 1998 b). No obstante, las concentraciones del agente esterilizante y la duración se deben escoger en función de minimizar los daños para los explantes, y se debe tener en cuenta la especie vegetal y tipo de explante, ya que no existe un procedimiento único (Mar-

gara, 1988; Roca, 1991; Mroginski, 1991). Después de aplicar los desinfectantes, los explantes se deben enjuagar varias veces con agua destilada estéril (González y Santana, 1988; Capote, 1993; Quintana, 1995).

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

- **Medios de cultivo:**

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

Para el cultivo de meristemos y ápices no existe un medio universal, sin embargo el medio MS basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes ha sido el más frecuentemente utilizado en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*. También se han empleado pero con menor frecuencia el Wh (White, 1943), B₅ (Gamborg *et al.*, 1968), BDS (Dunstan y Short, 1977) citados por Mroginski (1991), Jiménez (1998 b) y Luciani *et al.* (1998 a y b).

Los reguladores del crecimiento en pequeñas cantidades aumentan, inhiben o modifican de una u otra forma cualquier proceso fisiológico del vegetal (Pérez, 1994). Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable a la segunda, se favorece la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis (Smith, 1992; Dixon, 1994; Jiménez, 1998 b).

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio

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

Al contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemas que se emplean como material inicial para el cultivo *in vitro*, son los lugares de síntesis, se adicionan al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0.001-10 mg/L (Krikorian, 1991; Jiménez, 1998 b).

También se han empleado en los medios de cultivo las giberelinas (GA_3), ácido abscísico, etileno (Mroginski, 1991; Smith, 1992; Cevallos, 1998), y con mayor frecuencia los brasinoesteroides y oligosacarinas, que ejercen una acción similar o superior a los reguladores del crecimiento tradicionales, y además, tienen la ventaja que se adicionan en los medios de cultivo en bajas concentraciones (Núñez, 1996; Rodríguez *et al.*, 1996; Fujioka y Sakurai, 1997; Cabrera *et al.*, 1998).

- **Condiciones ambientales de incubación:**

Este requisito se debe cumplir rigurosamente para el éxito en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Para ello es conveniente que los explantes se incuben en ambientes controlados de luz (1 000-5 000 lux) y temperatura (20-28°C), así como de humedad relativa (70-80 %) acordes con los objetivos de trabajo. Estos efectos influyen prácticamente en todos los tipos de procesos: absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, entre otros (Pierik, 1990; Roca, 1991). No obstante, se debe tener en cuenta que cada cultivo tiene sus propias especificidades.

Propagación *in vitro*

El término de micropropagación según Krikorian (1991), se utilizó por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester, y se definió como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación de plantas, órganos, tejidos o células que produzcan un mayor número de plántulas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original.

Según Mroginski (1991) y Kitto (1997), entre las ventajas más importantes de este método de propagación cuando se compara con los convencionales están:

- 1.- Altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular volúmenes elevados de plantas en cortos períodos de tiempo.
- 2.- Rápida introducción de nuevas variedades o clones.
- 3.- Reducción del tiempo de multiplicación.
- 4.- Producción independiente de las condiciones ambientales.
- 5.- Incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y saneamiento.
- 6.- Uniformidad en las plantaciones producidas.
- 7.- Mejor facilidad para la comercialización.

Todo lo anterior está íntimamente relacionado con procesos de morfogénesis, que no es más que el resultado de una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos, que depende básicamente de la actividad y expresión de algunos genes. Este proceso está íntimamente relacionado con múltiples factores que son imposibles de definir aisladamente, ya que varían en dependencia de los tipos celulares, tejidos, especies y variedades. Además, actúan directa e indirectamente a nivel genético, desencadenando procesos de síntesis específicos como consecuencia de cambios metabólicos y bioquímicos (D'Amato, 1990; Novak, 1990 b).

Según Murashige (1974; 1977), la embriogénesis somática, los brotes adventicios y axilares, son tres procesos morfogénicos por los cuales puede ocurrir la multiplicación clonal *in vitro*.

A través de la embriogénesis somática, más de 140 especies vegetales han mostrado su capacidad regenerativa, entre las que se encuentran los cítricos, café, yuca, gramíneas y solanáceas (Santana *et al.*, 1988; Lozoya, 1990 a; Luckse *et al.*, 1997; Medero *et al.*, 1997). Es la técnica más rápida teórica y potencialmente para el clonaje *in vitro* de plantas; sin embargo, sus desventajas radican en el desconocimiento que existe sobre los parámetros que regulan este proceso y todavía en algunas especies se presentan características diferentes a las de sus progenitores (Gómez, 1998).

La organogénesis es un evento morfogénico, ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa, dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas adventicias y axilares (Jiménez, 1998 a).

Mediante los brotes adventicios se puede obtener un elevado número de plantas a través de la formación de tejido meristemático y su posterior diferen-

ciación en ápices, que surgen a partir de órganos o callos, y dan lugar con cierta frecuencia a plantas con variaciones genéticas, lo que constituye una dificultad por la inestabilidad de la descendencia obtenida. Es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares. En la literatura se hace referencia a la micropropagación por brotes adventicios en zanahoria, papa, cebolla, ajo, clavel y lechuga (Smith y Street, 1974; Roest y Bokelbann, 1976; Villalobos, 1991; Capote, 1993; Izquierdo *et al.*, 1995).

Los brotes axilares surgen del ápice del tallo y las yemas laterales; los sucesivos subcultivos traen consigo un incremento de la proliferación de brotes. Además, por esta vía se reducen las anomalías o variaciones en el genotipo de las plántulas micropropagadas. La eficiencia de este sistema está dada en que el número de plantas que se obtienen está determinado por el número de yemas axilares pre-existentes en el inóculo, las cuales se estiman por las condiciones *in vitro*, por lo que se forma una plántula por cada yema. Esta forma de propagación se aplica en col, tomate, lechuga, banano, pepino, calabaza y melisa (Kantha *et al.*, 1976; Koevary *et al.*, 1978; Handley y Chambliss, 1979; Villalobos, 1991; Díaz *et al.*, 1995; Takayama y Akita, 1996; Tavares *et al.*, 1996).

La propagación masiva de plantas será útil siempre que se cuente con un material de partida de alta calidad biológica, es decir, libre de virus que se haya obtenido por una o la combinación de varias técnicas biotecnológicas, tales como: cultivo de meristemo sólo o combinado con la termoterapia, quimioterapia o electroterapia y el diagnóstico posterior mediante antiseros específicos para comprobar la sanidad del material que se vaya a propagar posteriormente (Novak, 1990 a; Cionci, 1991; Conci y Nome, 1991; Vishnichenko *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1995; Bernal, 1997; Hernández *et al.*, 1997).

Etapas de la micropropagación clonal

Muchas cosas han cambiado desde que Murashige (1974), propuso las tres fases para la micropropagación de plantas. Debido a la información acumulada, la mayoría de los investigadores y micropropagadores de plantas están de acuerdo en que realmente se pueden diferenciar cinco fases para lograr una exitosa multiplicación (Orellana, 1998 a).

- **Fase 0: Preparativa**

Según Deberh y Maene en 1981 citados por Orellana (1998 a), es una etapa importante, o casi indispensable, en el desarrollo de un esquema de micropropagación, ya que es la fase en que se selecciona la planta donadora de los explantes y se determinan todas las condiciones para el posterior establecimiento de los mismos.

- **Fase 1: Establecimiento del cultivo aséptico**

El propósito general debe ser lograr un cultivo axénico y viable; incluye la selección del explante adecuado y su desinfección, así como su sobrevivencia.

- **Fase 2: Multiplicación**

Hay un incremento del número de brotes por plántulas que darán lugar a la formación de una planta; aquí se involucran un número determinado de subcultivos hasta el punto que no exista variabilidad genética. Para este fin es necesario establecer el medio de cultivo óptimo que se ajuste a los principales requerimientos de la especie vegetal, al tipo de explante, al sistema de cultivo, a la relación auxina/citoquinina presente en el medio de cultivo y los factores ambientales.

- **Fase 3: Enraizamiento**

Los propágulos de algunas variedades necesitan una etapa de cultivo adicional pues aún cuando la sobrevivencia no sea un problema, es necesaria esta etapa para el enraizamiento individual de los brotes, el incremento de su resistencia al estrés de humedad y enfermedades, para el establecimiento de las reservas de alimentos necesarios en el período de transición y para el desarrollo de la capacidad autotrófica, debido a que la apariencia verde de las plantas no es suficiente para poder realizar la fotosíntesis, ya que aunque los pigmentos fotosintetizadores estén presentes, las enzimas están en ocasiones ausentes o inactivas.

- **Fase 4: Adaptación**

El mayor obstáculo para el establecimiento de las plántulas que se obtienen por métodos *in vitro* es usualmente la transición del cultivo aséptico a casa de cristal no estéril y condiciones de campo (Novak, 1980), por lo que esta etapa reviste una gran importancia. En ella se realiza el trasplante de las plántulas al suelo y su posterior adaptación al medio ambiente. Para lograr un alto índice de sobrevivencia se necesita que las plantas tengan un sistema radical bien desarrollado y una alta humedad, necesaria para su protección lo que evita su desecación en los días posteriores al trasplante a suelo.

Empleo de las técnicas biotecnológicas en las aliáceas

Los primeros trabajos que se publicaron relacionados con la obtención de plantas de ajo libres de virus mediante el empleo de técnicas biotecnológicas fueron los de Wang y Huang en 1974 y Kehr y Schuffer en 1976 citados por Walkey *et al.* (1987).

Bhojwani (1980), evaluó el comportamiento *in vitro* del clon de ajo francés 'Rose-de-Kakylis' previamente saneado a virus. Desinfecta los dientes con etanol 30 segundos seguido de flameo, aisló los ápices caulinares entre 5-8 mm y los inoculó en el medio basal B₅ suplementados con 0.5 mg/L de 2-iP y 1 mg/L de ANA, obteniendo 5.8 brotes/explante como promedio en un mes mientras que con 0.5 mg/L de 6-BAP sólo obtuvo entre 2-4 brotes mientras que con el medio MS basal con las mismas concentraciones de ANA y 2-iP solamente logró 2.6 brotes/explante. Al transferir las plántulas al medio B₅ con 0.2 mg/L de ANA como suplemento hormonal logró el 100 % de enraizamiento; la adaptación a campo de las vitroplantas se realizó en una casa de cristal en potes que contenían como sustrato pumita:turba (4:1), pero sólo poco más del 50 % logró sobrevivir.

Posteriormente Walkey *et al.* (1987), obtienen plantas de *Allium sativum* y *Allium ascalonicum* libres de virus por cultivo de meristemas. Los explantes entre 0.5-0.8 mm crecieron mejor en el medio B₅ que en el MS cuando el mismo se enriqueció con AIA (2.5 mg/L) y 6-BAP (4-8 mg/L) o KIN (4-8 mg/L) siendo superior la combinación AIA y KIN, que formó entre 4-5 brotes/explante.

Uno de los primeros informes relacionados con la microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada fue realizado por Racca (1989). Este autor plantea que es posible utilizar como fuente de explante inicial ápices caulinares o meristemas y obtienen una tasa de multiplicación de 1:8 aproximadamente cada 60 días para los clones 'Rosado Paraguay' y 'Blanco' cuando se cultivan en un medio MS diluido a la mitad suplementado con 0.3 ppm de ANA y 3 ppm de 2-iP, un volumen de medio de 20 cm³/explante, un fotoperíodo corto (10 horas luz) y temperaturas frescas (18°C), pero las pérdidas fueron superiores al 70 % cuando se transfirieron las plántulas propagadas *in vitro* directamente a macetas. Este inconveniente lo solucionó transfiriendo las vitroplantas después de la fase de multiplicación a un medio MS diluido a la mitad sin suple-

mento de auxinas ni citoquininas, un volumen de medio de cultivo de 25 cm³/explante, días largos (16 horas luz) y cálidos (22°C); a los 90 días obtuvo un 62 % de bulbificación con 60 g/L de sacarosa sin cloruro de clorocolina (CCC), que es un retardante y un 61 % con 40 g/L de sacarosa y 500 ppm de CCC. Informa también, que los microbulbillos alcanzan una sobrevivencia superior al 85 % en campo, siempre y cuando su tamaño sea superior a los 3 mm de diámetro. Posteriormente Racca *et al.* (1989), informan que es más eficiente la inducción de los microbulbillos *in vitro* en un medio MS suplementado con 50 g/L de sacarosa.

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

Gómez (1992), informa entre 88-90 % de sobrevivencia cuando los dientes de los clones 'Criollo' se desinfectaron con Ca(OCl)₂ al 5 % durante 15 minutos y alrededor del 85 % en el 'Vietnamita' y entre 16-53 % de establecimiento *in vitro* de los meristemas en un medio compuesto por los macroelementos MS, los microelementos de Heller y las vitaminas de Morel suplementado con 1 mg/L de 6-BAP; las vitroplantas después de establecidas se transfirieron a un medio de enraizamiento sin 6-BAP donde se mantuvieron de 1-4 meses. La fase de adaptación se realizó colocando las vitroplantas en potes con materia orgánica durante 6 meses a la luz natural para obtener la semilla prebásica.

Van der Valk *et al.* (1992), informa la regeneración de plantas a partir de embriones cigóticos provenientes del cultivo de callo de diferentes variedades y accesiones de *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium porrum* y el híbrido interespecífico *Allium fistulosum* x *Allium cepa*. Los callos embriogénicos se indujeron en el medio MS enriquecido con 5 mM de 2,4-D. En todos los casos se obtuvo regeneración de plantas cuando se transfirieron los callos al medio anterior suplementado con 5.1 mM de KIN y 1 mM de ácido abscísico.

Ashalata y Bong (1993), informan que los mejores resultados en la desinfección de yemas florales de *Allium senescens* var. 'Minor' es empleando en NaOCl al 5 y 9 %.

Capote (1993), establece una metodología para la micropropagación *in vitro* de genotipos cubanos de cebolla, en la que utiliza una doble desinfección para las yemas, después de lavadas las mismas con agua corriente se sumergieron en etanol (70 %-10') y NaOCl (5 %-20'), después de retirarle las hojas más externas se colocaron en NaOCl (5 %-10') y se enjugaron con agua destilada estéril, logrando un 90 % de desinfección. Estas yemas se inocularon en un medio MS reducido a la mitad, que se suplementó con 0.5 mg/L de ANA y 4 mg/L de 6-BAP; la inducción de brotes en el primer subcultivo fue de 12.8 y en el segundo de 6.2 para la variedad 'Caribe-72', diferenciándose estadísticamente del resto de los genotipos; los brotes enraizaron en un medio basal antes expuesto en estado líquido enriquecido con 0.5 mg/L de ANA y la adaptación a las condiciones de campo se realizaron mediante siembra directa en organopónico con 50 % de suelo y 50 % de materia orgánica y la aplicación de oniobiostín.

INTA (1993), informa que diferentes líneas de ajo 'Colorado' presentan un mejor comportamiento *in vitro* que los 'Blanco', mientras que en su primera etapa *in vivo* los genotipos 'Blanco' se comportan mejor que los 'Colorado'. Agrega, que los microbulbillos de más de 6 mm manifiestan una actitud de brotación tres veces mayor para los materiales de tipo 'Blanco' y de hasta 14 veces mayor para los 'Colorado', que los inferiores a 2 mm.

Ravnikar *et al.* (1993), estudian la influencia del ácido jasmónico (AJ) en la formación de brotes y bulbos por cultivo *in vitro* en *Allium sativum* cv. 'Ptuj'. La desinfección la realizaron con etanol 70 % y posteriormente con NaOCl (2.4 %-15') y le agregaron una gota de Tween 80 y luego lavaron los dientes con agua destilada estéril tres veces. Los mejores resultados los alcanzaron con el medio B₅ suplementado con 10 mM de AJ y 5 mM de 2-iP con 18 brotes/explante y un 55.8 % de bulbificación *in vitro*.

Posteriormente Gómez *et al.* (1993), hacen referencia a la obtención de diferentes genotipos de ajo libres de virus mediante cultivo de meristemos, que en condiciones de campo alcanzaron un porcentaje de bulbificación entre 67-88 % para los clones 'Criollo' y 75 % para el 'Vietnamita'.

Marrero y Agramonte (1994), informaron la obtención de plantas de ajo a partir de callos cuando emplearon explantes directamente del diente e incubados en la oscuridad y cultivándose en presencia de 1 mg/L de 2,4-D combinado con 2 mg/L de AIA y KIN de cada uno. Los callos que se formaron con menores niveles de 2,4-D dieron lugar a mayor número de plantas cuando se cultivaron en ausencia de 2,4-D. Agregan, que a medida que aumenta el número de subcultivos en el medio de formación de callos, aumenta el porcentaje de callos que dan lugar a plantas y éstas últimas alcanzaron un 73.6 % de sobrevivencia cuando se sembraron en cajas de poliespuma que contenían 70 % de suelo y 30 % de casting (humus de lombriz).

Hernández *et al.* (1994), utilizan como explantes meristemos y ápices caulinares en diferentes clones y variedades de ajo y obtienen entre 29-75 % de establecimiento de los meristemos en la variedad 'Criollo' y entre 5.2-36.3 % con la 'Vietnamita' mientras que con los ápices alcanzan un 82.9 % ('Criollo') y 50 % ('Vietnamita') cuando se inician en un medio basal suplementado con 0.1 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de 2-iP. En relación con el coeficiente de multiplicación, los resultados para la variedad 'Criollo' fueron de 4.6; 3.3; 2.6; 1.5 y 1 brotes/explante en cada subcultivo respectivo cuando se indujeron en un medio basal enriquecido con 0.1 mg/L de ANA y 1 mg/L de 2-iP mientras que el mayor porcentaje de bulbificación *in vitro* fue de 80 % en un medio MS con 1 mg/L de AIA y 50 g/L de sacarosa.

Castillo *et al.* (1998), cultivaron meristemos *in vitro* de diferentes clones de ajo seleccionados, llegando a obtener rendimientos, en algunos casos 100 % superior con respecto al material no saneado; la tasa de multiplicación osciló entre 3.5-6 brotes /explante en dependencia del genotipo y no hubo diferencias entre los medios de cultivo que se evaluaron para la fase de multiplicación y de bulbificación. Las diferentes respuestas se debieron al efecto del genotipo.

Curvetto *et al.* (1998), indujeron la producción de brotes múltiples desde las axilas de las hojas de plántulas provenientes de semilla; se extrajeron asépticamente los embriones de las semillas de cebolla variedad 'Valcatorce INTA', que se cultivaron en el medio BDS suplementado con 30 g/L de sacarosa; los mejores resultados se obtuvieron con 1 mg/L de ANA y 10 mg/L de 6-BAP; en el primer subcultivo se obtuvieron plántulas simples en todos los tratamientos, que posteriormente se dividieron a la mitad para estimular

la brotación de yemas axilares y adventicias, los dos últimos subcultivos se obtuvieron 8.3 vástagos/explante con un 62% de explantes en multibrotación (más de 5 vástagos/explante).

Gidekel y Valladares (1998), desarrollaron un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa en ajo, los explantes se desinfectaron con etanol al 50 % durante 30 segundos, posteriormente se pasaron a NaOCl (10 %-15') y después se colocaron en captan:benlate (1.5:0.5 g/L) durante 20 minutos. Se disectaron las plantas en forma longitudinal y se seccionaron las yemas cada 5 mm desde la base hasta el ápice. Obtuvieron como resultados que el hipocótilo cuando se utilizó como explante formó callo en un 70 % en un medio MS suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D, 3 mg/L de KIN y 1.5 mg/L de picloran, mientras que la regeneración de plantas se obtuvo cuando se transfirieron los callos al medio anterior enriquecido con 5-6 mg/L de 6-BAP con un 60 % de eficiencia.

López y Lara (1998), estudiaron diferentes explantes: semillas, raíz y parte basal de bulbos de cebolla en las variedades 'Santa Elena' (SE), Santa Teresa (ST) y el genotipo Cojumatlán (CO). El medio MS suplementado con 2,4-D y ANA promovió la formación de callos no embrionarios, los cuales en presencia de KIN regeneraron brotes; la mejor respuesta fue observada en el genotipo ST. Los callos embrionarios se obtuvieron en presencia de 2,4-D y KIN a los 30 días. El 90 % de los embriones en condiciones limitadas de nitrógeno, alcanzaron la etapa bipolar a los 25 días, mientras que los que se desarrollaron en un medio con nitrógeno, sólo desarrollaron un 20 % de embriones bipolares y el resto se mantuvo en etapa globular.

Luciani *et al.* (1998 a), evaluaron el efecto de la aplicación exógena de ácido jasmónico (AJ) y de diferentes reguladores del crecimiento en la formación de brotes y bulbillos de los clones de ajo colorado 'ESA' e 'I50'. Ellos observaron diferencias entre los clones en la proporción de la multiplicación, así como entre los subcultivos, los reguladores del crecimiento y el AJ. Las mejores proporciones promedios fueron de 18 y 33 brotes/explante en un medio BDS basal enriquecido con 10 mM de AJ en el tercer subcultivo para los genotipos 'I50' y 'ESA', respectivamente mientras que el porcentaje de bulbificación osciló entre 20-40 % cuando se le agregó 50 mM de AJ al medio basal, y se obtuvieron bulbillos entre 10-600 mg. Además, el AJ ejerció un efecto positivo tanto en la formación de brotes como de

bulbillos y el 2-iP supera la combinación 6-BAP y ANA en la proporción de multiplicación.

Luciani *et al.* (1998 b), estudiaron el efecto de la aplicación exógena de ácido traumático (AT) en la micropropagación de ajo (*Allium sativum* L. cv. 'Español', selección Médanos). Los mejores resultados se alcanzaron cuando se suplementó el medio BDS basal con 1 g/L de $\text{Ca}_2(\text{NO}_3)_2$, 7 g/L de agar, 30 g/L de sacarosa, 5 mM de ANA y 10 mM de 6-BAP con 7.2, 12.3 y 7 brotes/explante en los tres subcultivos que se realizaron; al aumentar la concentración de AT disminuye la inducción de brotes múltiples y se incrementa la bulbificación, que oscila entre 26-30 % y el AT interviene en los mecanismos de estrés y bulbificación.

Quezada *et al.* (1998), disectaron meristemos apicales, que se cultivaron en los medios MS, B_5 y $\text{MS} + \text{B}_5$, durante seis semanas, los mejores resultados se obtuvieron con el ecotipo 'Rosado de Italia', que alcanzó una altura promedio de 108.9 mm y 26.5 % de decesos, mientras que el ecotipo 'Colorado de Mendoza' alcanzó un promedio de altura de 83.2 mm y 33.8 % de decesos, el medio basal en que se desarrollaron mejor los explantes fue en el $\text{MS} + \text{B}_5$. Durante la etapa de multiplicación de brotes, el ecotipo 'Colorado de Mendoza' produjo 3.1 brotes, mientras que el 'Rosado de Italia' sólo produjo 1.4 brotes cuando se cultivaron en el medio $\text{MS} + \text{B}_5$ suplementado con 2-iP (1-3 mg/L) y ANA (0.1-0.3 mg/L) o AJ (1-2 mg/L). En la etapa de microbulbificación, se obtuvieron microbulbillos de 3-10 mm de diámetro, con pesos que oscilaron entre 0.025-0.555 g, similares a pequeños dientes de un bulbo de ajo normal en el mismo medio basal citado anteriormente pero enriquecido con sacarosa (50 g/L) y AJ (1-2 mg/L).

Izquierdo (2000), estudió los clones 'Criollo-3', 'Criollo-6', 'Criollo-9', 'Martínez' y 'Vietnamita' en cada fase para la micropropagación del cultivo y obtuvo como resultados que tanto el hipoclorito de calcio (5 %-20') como el hipoclorito de sodio (10 %-15', con 5 % de Cl_2 activo) son efectivos en la desinfección de los explantes, sobrevivencia y vigor de las plántulas; los explantes se establecen mejor y en menor tiempo en un medio MS basal suplementado con ANA (0.1 mg/L) + KIN (0.1 mg/L); se obtienen entre 4.9-7.3 brotes/explantes, en dependencia del subcultivo y del clon en el medio anterior enriquecido con ANA (0.1 mg/L) + 2-iP (4 mg/L); el mayor porcentaje de bulbificación *in vitro* se induce en el medio basal antes citado cuando se le adi-

cionan 75 g/L de sacarosa y los microbulbillos son superiores a las vitroplantas, alcanzan entre 95.35-99.40 % de sobrevivencia cuando se plantan en cepellones que contengan un sustrato compuesto por Zeolita (25 %) + M.O (75 %). En la fase de campo el número de dientes/bulbo, diámetro del bulbo, masa media y anchura del diente fueron los que más contribuyeron a la variabilidad. El rendimiento alcanzado por estos genotipos fue: 'Criollo-3' (13.28 t/ha), 'Criollo-6' (13.52 t/ha), 'Criollo-9' (15.01 t/ha), 'Martínez' (14.00 t/ha) y 'Vietnamita' (11.43 t/ha) durante la fase de producción de semilla básica de alta calidad biológica durante el período 1997-1999. Con los resultados que obtuvo, estableció una nueva metodología para la propagación *in vitro* de estos genotipos de ajo hasta la fase de campo con rendimientos superiores a los informados para el país (Cuba. MINAG, 1983) y a los de la FAO (1997) 

Bibliografía

ABIKO, K., Y. WATANABE Y Y. NISHI.

1998 Studies on garlic mosaic I. Causal virus. *Veg. and Orn.*

AGRAMONTE, D.; F. JIMÉNEZ Y MIGUEL A. DITA.

1998 Aclimatización.— p. 193-206. *En*: Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología.— Santa Clara: IBP, — 390 p.

ALVARADO, YELENYS; M. SUÁREZ; R. TRIANA; Z. PÉREZ; D. AGRAMONTE; L. GARCÍA; Z. SARRÍA; M. ACOSTA Y H. GRILLO.

1998 Control de la contaminación microbiana en la propagación masiva de plantas. *En*: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, [b].— p. 39.

ALVARADO, YELENYS; Z. SARRÍA; N. PORTAL; Y. MARTÍNEZ; M. FREIRE; E. QUIJAL; I. HERRERA; M. RODRÍGUEZ Y T. PICHARDO.

1998 Control de la contaminación bacteriana en el cultivo *in vitro* de plantas por la aplicación del método de detección temprana. *En*: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, junio 1-5. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, [a].— p.39.

ARENCIBIA, A.; A. MOLINA; G. DE LA RIVA; G. SELMAN-HOUSEIN.

1995 Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Reports* 14: 305.

ASHALATHA, S. N. Y S. BONG.

1993 Plantlet regeneration from callus initiated from flower buds in the wild species *Allium senescens* var. 'Minor'. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34: 205-207.

BARBÓN, R.

1997 Transformación genética del café (*Coffea arabica* L. var. 'Caturra rojo') mediante electroporación de suspensiones celulares embriogénicas.— 1997— 86 p.— Tesis (Master en Biotecnología Vegetal): Universidad Central de Las Villas: IBP.

BERNAL, F.

1997 Saneamiento del PLRV en variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.).— 1997.— 62 p.— Tesis (Master en Biotecnología).— Villa Clara. IBP.

BHOJWANI, M. W.

1980 *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci. Hortic.* 13: 47-52.

BURBA, J. L.

1992 Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum* L.). *En*: Producción, poscosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate.— Santiago de Chile: FAO, — p. 63-126.

BURBA, J. L. Y M. P. BLANCO.

1986 El Índice Visual de Superación de Dormición (IVD) como parámetro para el agrupamiento de cultivares en colecciones y bancos de germoplasma. *En*: Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Horticultura, 9^{na} y Reunión Latinoamericana de Horticultura, 2^{da}.— La Plata, Argentina, p. 66.

CABRERA, CARMEN Y P. ELLIOT.

1996 La cabeza que sólo tiene dientes. Primer Encuentro sobre agricultura urbana y su impacto en la alimentación de la comunidad. *Se puede* 1 (5): 22-23.

CABRERA, J. C.; R. IGLESIAS; A. GUTIÉRREZ; S. GONZÁLEZ; ESTHER DIOSDADO; R. GÓMEZ; D. AGRAMONTE; H. IZQUIERDO Y J. GONZÁLEZ.

1998 *PECTIMORF*: Un biorregulador cubano para la biotecnología vegetal. *En*: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Bioproductos. Resumen, - p. 491-492.

- CAPOTE, AMELIA.
1993 Estudio del comportamiento *in vitro* de cultivos cubanos de cebolla (*Allium cepa* L.).— 1993.— 35 p.— Tesis (Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas). Resumen.- Universidad de La Habana.
- CASTILLO, A.; M. CEPPEA; M. RIZZA; D. MAESO; G. DEL PINO; G. RODRÍGUEZ Y F. VILARÓ.
1998 Producción de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) de sanidad mejorada. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, - p. 102.
- CEVALLOS, A. M.
1998 Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea sp.*). Determinación de marcadores morfo-histológicos y bioquímicos.— 1998.— p. 16.— Tesis (Maestro en Ciencias en Biotecnología Vegetal).— La Habana. INCA.
- CONCI, VILMA Y S. F. NOME.
1991 Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J. Phytopathology* 132: 186-192.
- CONCI, VILMA.
1991 Virus de ajo. Diagnóstico y obtención de plantas libres. En: 1^{er} y 2^{do} Curso-Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de ajo.— Argentina: INTA, - p. 59-60.
- CONCI, VILMA; S. F. NOME; D. MORICONI.
1987 El ajo, origen del material élite. En: Italia, R. R. (Ed.). Ajo de sanidad controlada. Informe Técnico (16).— Argentina: INTA, — p. 4-6.
- CUBA. MINAG.
1983 Instructivo Técnico del cultivo del ajo. Dirección Nacional de Cultivos Varios, — 40 p.
- CURVETTO, N.; P. MARANGELI; D. ZAPPACIATA.
1998 Inducción de multibrotación en plántulas de cebolla. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, - p. 75-76.
- D'AMATO, F.
1990 Somatic nuclear mutations *in vivo* and *in vitro* higher plants. *Cariologia* 43 (304): 191-204.
- DÍAZ, P.; O. OLIVA; Y. GUÍA; H. LEONARD; M. SIMÓN; M. PIEDRA Y M. SUNCHIZ.
1995 Producción masiva de coles a partir de vitroplantas. *Revista Centro Agrícola* 3: 43-46.
- DIXON, R. A.
1994 Plant cell culture. A practical approach / R. A. González.— New York: IRL Press Oxford Univ., — 230 p.
- ENGELAND, R.
1996 Growing great garlic.— 7. Ed.— Okanogan. Washington: Filaree Productions, - 213 p.
- ETOH, T.
1983 Germination of seeds obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. *Proc. Japan Acad.* 59 (4): 83-87.
- FAO
1988 Intercambio y manejo de germoplasma *in vitro* de ajo.— Santiago de Chile: FAO-INIA, Estación Experimental “La Platina”, - 9 p.
1991 Intercambio y propagación de germoplasma de ajo a través de microbulbillos.— Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias, - 45 p.
1995 Producción. Yearbook 84.— Roma: FAO, — p. 139-141.
1999 Producción. Yearbook 52.— Roma: FAO, — p. 137.
- FERNÁNDEZ, ALICIA.
1999 Efecto del Biobras-6 en el crecimiento y desarrollo del ajo (*Allium sativum* L.).— 1999.— 60 p.— Tesis (Master en Biología Vegetal). Universidad de La Habana.
- FIGUEREDO, MERCEDES; J. R. SAVÓN; ALEYDA MARRERO; J. R. HUNG; JULIA M. SALGADO Y HAYDEÉ ECHEVARRÍA.
1999 Nuevos clones de ajo.— IIHLD.— MINAG: 13 Forum de Ciencia y Técnica, — 4 h.
- FUJIOKA, S. Y A. SAKURAL.
1997 Brassinosteroids. *Natural Product Reports* 19 (1): 1-10.
- GIACONI, V.
1993 Cultivo de hortalizas. / M. Escaff.— 8. ed.— Santiago de Chile: Editorial Universitaria: INIA, — p. 93-103.
- GIDEKEL, M. E ISABEL VALLADARES.
1998 Obtención de un eficiente sistema de regeneración *in vitro* de ajo susceptible de ser implementado en la transformación genética. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, - p. 88-89.

- GIMÉNEZ, ADRIANA; ELENA ARANITI; VIVIAN GUINTE; H. ROBY; J. LLERA Y PATRICIA WINTER.
1998 Ajo cv. 'Colorado' (*Allium sativum* L.). Manejo postcosecha. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* XXX (1): 47-54.
- GÓMEZ, OLIMPIA Y J. R. SAVÓN.
1992 Estudio de parámetros genéticos en el ajo (*Allium sativum*). *Agrotecnia de Cuba* 24 (3-4): 33-37.
- GÓMEZ, OLIMPIA.
1992 Desinfección y saneamiento de la semilla ajo para su establecimiento *in vitro*. Informe Técnica.—INRA-Francia, — 4 h.
- GÓMEZ, OLIMPIA; J. R. SAVÓN; J. ESPINOSA Y TANIA HERNÁNDEZ.
1991 Estudio de la variabilidad encontrada en clones de ajo en la provincia de La Habana. *Agrotecnia de Cuba* 23 (1-2): 1-4.
- GÓMEZ, OLIMPIA; T. DEPESTRE; H. IZQUIERDO; ROSALINA DISOTUAR; CARMELINA VÁZQUEZ; S. RAMÍREZ; MARÍA J. BEJERANO; ESTHER L. PERALTA Y E. DALMAU.
1993 Obtención de clones de ajo libres de virus por cultivo de meristemas.—IIHLD-MINAG: 8^{vo} Forum de Ciencia y Técnica, — 10 h.
- GÓMEZ, R.
1998 Embriogénesis somática.— p. 57-79. *En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología.*—Santa Clara: IBP, — 390 p.
- GONZÁLEZ, MARÍA C. Y NANCY SANTANA.
1988 Desinfección de semillas de arroz (*Oriza sativa* L.) para su siembra *in vitro*. *Cultivos Tropicales* 10 (2): 80-84.
- HANDLEY, L. W. Y O. L. CHAMBLISS.
1979 *In vitro* propagation of *Cucumis sativus* L. *Hort Science* 14: 22.
- HERNÁNDEZ, R., ODALYS PRADO; V. GIL; J. PÉREZ; MARTHA RUÍZ Y CARIDAD FONT.
1994 Producción de ajo (*Allium sativum* L.) libre de virus mediante cultivo de meristemas. *Centro Agrícola* 21(1): 476-84.
- HERNÁNDEZ, R.; J. C. NOA, TATIANA PICHARDO Y YANET IGARZA.
1995 Saneamiento al complejo viral del ajo (*Allium sativum* L.) mediante termoterapia y cultivo de meristemas. *Cuadernos de Fitopatología: Revista de Fitopatología y Entomología*. 12 (47): 194-195.
- HERNÁNDEZ, R.; J. FONTANELLA; J. C. NOA; R. MANSO; TATIANA PICHARDO Y H. CÁRDENAS.
1997 Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. con optimización del diagnóstico por μ MELISA. *Centro Agrícola* 24 (1): 64-65.
- INTA
1993 Informe Anual 1992.— La Consulta: INTA, E. E. A. "La Consulta".—77 p.
- IZQUIERDO, H.
2000 Propagación *in vitro* de genotipos cubanos de ajo (*Allium sativum* L.). — 92 p.— Tesis (Master en Biología Vegetal). Ciudad de La Habana.—Universidad de La Habana, 2000.
- IZQUIERDO, H.; ROSALINA DISOTUAR; OLIMPIA GÓMEZ S. RAMÍREZ; CARMELINA VÁZQUEZ; MARÍA J. BEJERANO; ESTHER L. PERALTA; T. DEPESTRE Y E. DALMAU.
1995 Multiplicación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) en condiciones tropicales. *Avances en Biotecnología Moderna* 3.— Ciudad de La Habana: CIGB, — p.II.20.
- JIMÉNEZ, E.
1998 Cultivo de ápices y meristemas.— p. 45-56. *En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.*— Santa Clara: IBP, [b].— 390 p.
- 1998 Generalidades del cultivo *in vitro*.— p. 13-24. *En: Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.*— Santa Clara: IBP, [a].— 390 p.
- KARTHA, K. K.; O. L. GAMBORG; J. P. SHYLUK Y F. CONSTABEL.
1976 Morphogenetic investigation on *in vitro* leaf cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Starfire') and high frequency plant regeneration. *Zeitschr fur Pflanzenphysiol.* 77 (4): 292-301.
- KITTO, S. L.
1997 Comercial micropropagation. *HortScience* 32 (6): 1-3.
- KOCH, H. P.
1993 Garlicin-factor fiction? The antibiotic substance from garlic (*Allium sativum*). *Phytotherapy Res.* 7: 278-280.
- KOEVARY, K.; L. RAPPAPORT Y L. MORRIS.
1978 Tissue culture propagation of head lettuce. *Hort Science* 13: 39.

- KOTLINSKA, T. P.; P. NARANKE; M. NAVRATIL; L. GEROSIMOVA; A. PIMAKHOV; S. NIEKOUV.
- 1990 Collecting onion, garlic and wild species of *Allium* in Central Asia. *Plant. Genetic. Res. Newsletter* 83/84: 31-32.
- KOUL, A. K. y R. N. GOHIL.
- 1970 Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum*. *Citología* 35: 197-202.
- KRIKORIAN, A. D.
- 1991 Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: Roca, M. N. y L. A. Mroginski (Eds.). Cultivos de Tejidos en la Agricultura Tropical. Fundamentos y Aplicaciones.— Cali: CIAT, - p. 41-77.
- LEÓN, MARÍA E.
- 1991 Estudio del régimen de riego, densidades de siembra y su influencia en la conservación de distintos clones de ajo. Informe Final de Etapa. Resultado 510.
- LINDSEY, K.
- 1992 Biotecnología Vegetal Agrícola. / M. G. K. Jones.— España: Editorial Acribia, — 276 p.
- LÓPEZ, P. y M. LARA.
- 1998 Inducción de embriogénesis somática y organogénesis de variedades mexicanas de cebolla (*Allium cepa*). En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, — p. 147-148.
- LOZOYA, H.
- 1990 Embriogénesis somática. En: Cadmo, H. R. y V. M. Villalobos (Eds.). Fundamentos Teórico Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales.— Roma: FAO, — p. 33-36.
- LUCIANI, G.; P. MARINANGELI y N. CURVETTO.
- 1998 a Citocininas y ácido jasmónico en la morfologénesis *in vitro* de ajo colorado. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, - p. 92-93.
- 1998 b Curvettocido traumático en la formación *in vitro* de brotes y bulbillos de ajo colorado (*Allium sativum* L.). En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, — p. 147-148.
- LUCKSE, ELIZABETH; TAMARA D. DINKOVA y M. RAMOS.
- 1997 Aspectos bioquímicos-moleculares de la embriogénesis somática en plantas. *Ciencias Biológicas* 27 (1-2-3): 13-17.
- MARGARA, J.
- 1988 Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis.— Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, — 232 p.
- MARRERO, D. y D. AGRAMONTE.
- 1994 Obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) a partir del cultivo de callos. *Cultivos Tropicales* 15 (3): 97.
- MCCOLLUM, G. D.
- 1976 Onion and allies; *Allium* (Liliaceae). En: Simmonds, N. W. (Ed.). Evolution of crop plants.— London: (s.n.), — p. 186-190.
- MEDERO, V.; E. PADRÓN; S. RODRÍGUEZ; R. GÓMEZ; MAGALY GARCÍA; J. LÓPEZ; J. VENTURA; MARILYN MARTÍNEZ y M. ALVAREZ.
- 1997 Regeneración por embriogénesis somática en clones cubanos de yuca. *Agrotecnia de Cuba* 27 (1): 92-96.
- MESSIAEN, C. M.
- 1993 Les *Allium* alimentaires reproduits por voie végétative. / J. Cohot, J. P. Leroux, M. Pichon y A. Beyries.— París: Ediciones INRA.— 225 p.
- MISAWA, M.
- 1994 Plant issue culture: an alternative for production of useful metabolites. *FAO Agricultural Services Bulletin* 108, — 87 p.
- MROGINSKI, L. A.
- 1991 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. / W. M. Roca. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (Eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.— Cali: CIAT, — p. 10-12.
- MURASHIGE, T.
- 1974 Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- 1977 Clonal crops through tissue culture. En: Barz, W.; E. Reinhard y M. H. Zenk (Eds.). Tissue culture and its biotechnological application.— Nueva York, - p. 392-403.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG.
- 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAVARRO, S.
- 1991 Cultivo de meristemos. En: D. Hurtado y María E. Merino. Cultivo de Tejidos Vegetales.— 2. reimp.- México, — p. 133-148.

- NOVAK, F. J.
1980 Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzuchtg* 84: 250 - 260.
- 1990 [a] *Allium* tissue culture. In: Rabinowitch, H. D. y J. L. Brewster (Eds.). Onions and Allies Crops 1.— Florida: CRC Press: Inc. Boca de Ratón, — p. 234-250.
- 1990 [b] Plant tissue cultures techniques for mutation breeding.— Viena: FAO/IAEA Press.— 169 p.
- NÚÑEZ, MIRIAM.
1996 Los brasinoesteroides y su actividad biológica.— La Habana: INCA, — 35 p.
- ORELLANA, P.
1998 a Introducción a la propagación masiva.— p. 151-178. En: Ponce, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología.— Santa Clara: IBP, — 390 p.
- 1998 b Propagación vía organogénesis.— p. 180-203. En: Ponce, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología.— Santa Clara: IBP, — 390 p.
- PAI, S. T. Y M. W. PLATT.
1995 Antifungal effects of *Allium sativum* (garlic) extract against the *Aspergillus* sp. Involved in otomycosis. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 14-18.
- PEÑA - IGLESIAS, A. Y P. AYUSO.
1983 Characterization of Spanish garlic viruses and their elimination by *in vitro* shoots apex culture. *Acta Horticulturae* 127: 183-193.
- PÉREZ, A.; A. ALFONSO; TERESA FERNÁNDEZ Y JACQUELINE ALONSO
1995 El uso de quimioterapia y termoterapia en la implantación de meristemos *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.). *Avances en Biotecnología Moderna*.— Ciudad de La Habana: CIGB, — p. II.21.
- PÉREZ, G. F.
1994 Introducción a la Fisiología Vegetal. / J. B. Martínez.— España: Ediciones Mundi-Prensa.— 218 p.
- PIERIK, R. L. M.
1990 Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.— Madrid, — p. 91-213.
- QUEZADA, J. A.; M. E. ASCARRUNZ; M. A. SILVA.
Evaluación del potencial de regeneración de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) en el proceso de microbulbificación *in vitro*. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, 1998.- p. 70.
- QUINTANA, MARIBEL.
1995 Cultivo *in vitro* en *Vigna luteola*'SC-123'.— 1995.— 62 p. Tesis (Master en Biotecnología Vegetal); IBP.
- RACCA, R. W.
1989 La microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada; un paso esencial en la transferencia a tierra. En: Curso/Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de ajo, 1^{ro}.— Argentina: INTA, — p. 3-6.
- RACCA, R. W.; A. LOSAN; G. DE BILLERBECK; VILMA CONCI Y O. BONGIORNO.
1989 Microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada. En: XII Reunión de la Sociedad Argentina de Horticultura. Resúmenes, — p. 35.
- RAVNIKAR, MAJA; JANA ZEL; I. PLAPER Y ALENKA SPACAPAN.
1993 Jasmonic acid stimulates shoots and bulb formation of garlic *in vitro*. *Journal of Plant Growth Regulation* 12: 73-77.
- ROCA, W. M.
1991 Establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. / L. A. Mroginski. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.— Cali: CIAT, - p. 2-17.
- ROCA, W. M.; L. C. MUÑOZ; P. CHAVARRIAGA Y H. RAMÍREZ.
1993 The potential role of biotechnology in the improvement of plants. En: Sasson, A. y V. Constantini. Plant Biotechnologies for Developing Countries, — p. 5.
- RODRÍGUEZ, J. B.; D. ECHEMENDÍA Y C. URTEAGA.
1996 Optimización del cultivo *in vitro* y evaluación de brasinoesteroides sintéticos en callos de *Glicine max* (L.) Merr. En: X Seminario Científico del INCA, — p. 157-158.
- RODRÍGUEZ, J. F.; H. PINZÓN; H. LAVERK; G. CORCHULO.
1998 Comportamiento del crecimiento y desarrollo del ajo (*Allium sativum* L.) cv. 'Rosado Criollo'. *Agronomía Colombiana* 15 (1): 76-81.
- ROEST, S. Y G. S. BOKELBANN.
1976 Vegetative propagation of *Solanum tuberosum*. *Potato Res.* 19 : 173.

- SALGADO, JULIA M.; ALICIA FERNÁNDEZ; J. R. SAVÓN Y ODALYS BRUZÓN
1997 Estudio preliminar del efecto de los brasinoesteroides en la conservación postcosecha del ajo 'Hov-1'. *Agrotecnia de Cuba* 28 (1): (En prensa).
- SANTANA, NANCY; O. MARTÍNEZ Y MARÍA C. GONZÁLEZ.
1988 Embriogénesis somática en el cultivo del café (*Coffea arabica*) (Parte D). *Cultivos Tropicales* 10 (2): 36-43.
- SAVÓN, J. R.; A. AYALA Y D. LORDANOV.
1987 Influencia de la distancia entre plantas y fechas de plantación sobre los rendimientos de ajo (*Allium sativum* L.). *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Hortalizas, Papa, Granos y Fibras* 6 (2): 39-50.
- SMITH, S. M. Y H. E. STREET.
1992 The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) a serially subcultured. *Ann. Bot.* 38: 223-241.
- TAKAYAMA, S. Y M. AKITA.
1996 Biorreactor advances for the large-scale production of propagules. In: Cost 822 Workshop on Somatic Embryogenesis, artificial seeds and biorrectors. San Remo, 6-7 September, — p. 2.
- TAVARES, A. C.; M. C. PIMENTA; M. T. GONCALVES.
1996 Micropropagation of *Melissa officinalis* L. through proliferation of axillary shoots. *Plant Cell Report* 15 (6): 441-444.
- TRAUB, H. P.
1968 The subgenera, sections and subsections of *Allium*. *Plant Lif.* 24: 147-163.
- VAN DIJK, P.; M. VERBEEK Y L. BOS.
1991 Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species, and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. *Neth J. Pl. Path.* 97: 381-399.
- VASIL, I. K.; M. R. AHUJA Y V. VASIL.
1979 Plant tissue cultures in genetic and plant breeding. *Advances in Genetics* 20: 127-215.
- VIEIRA, G. S.; V. W. D. CASALI; J. DE S. SILVA; J. M. GÓMEZ; F. A. FERREIRA Y J. T. L. THIEBANT.
1988 Dormancia de bulbos de alho 'Gigante Roxo' sometidos a cura artificial. En: Congreso Barsilero de Olericultura, 28°. Resumen 238, — p. 79.
- VILLALOBOS, V. M.
1990 Historia del cultivo de tejidos vegetales. En: Fundamentos Teórico Práctico del Cultivo de Tejidos Vegetales.— Roma: FAO, — p. 3-7.
1991 Micropropagación: concepto, metodología y resultados. / T. A. Thorpe. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.— Cali: CIAT, — p. 127-142.
1991 Micropropagación: concepto, metodología y resultados. / T. A. Thorpe. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (Eds). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.— Cali: CIAT, — p. 127-142.
- VISHNICHENKO, V. K.; T. N. KONAREVA Y S. K. ZAVRIEV.
1993 A new filamentous virus in shallot. *Plant Physiology* 42: 121-126.
- WALKEY, D. G. A. Y D. N. ANTILL.
1989 Agronomic evaluation of virus-free and virus-infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science* 64 (1): 53-60.
Crops. Res. St. Service 7: 139-147, 1980.
- WALKEY, D. G. A.; M. J. W. WEBB; C. J. BOLLAND Y A. MILLER
1987 Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of Horticultural Science* 62 (2): 211-220.

**Humberto Izquierdo Oviedo
y Yovany Quiones Ocegüera**

División de Biotecnología, Fisiología y Resistencia del
Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova".
Facultad de Biología
de la Universidad de La Habana, Cuba.