

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

Multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *in vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*) para la formación de Microbulbillos

Para optar el título profesional de

Ingeniero Agrónomo

Autora: Bach. Rossana Tania FALCON RAMOS

Asesora: Dra. Edith Luz ZEVALLOS ARIAS

CERRO DE PASCO - PERÚ - 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *in vitro* de tres variedades de Ajos (*Allium sativum. L*) Para la Formación de Microbulbillos

Sustentada y aprobada ante los miembros del jurado:

Mg. Andrés Edwin LEON MUCHA

PRESIDENTE

Mg. Manuel LLANOS ZEVALLOS

MIEMBRO

Mg. Fernando James ALVAREZ RODRIGUEZ

MIEMBRO

DEDICATORIA

Con eterno cariño y nostalgia en memoria a mi madre Zoraida, por su abnegado sacrificio en los momentos más difíciles y el esfuerzo con lo que se hizo posible la culminación de mi más anhelado estudio.

Con sinceridad y estima a mi esposo Christian, y hermanos Jheyemi, Marleny, Jhonatan, Jhan, Jhuniór, quienes estuvieron a la expectativa de la aventura encaminando a mi desarrollo profesional.

Con mucho afecto a mis colegas de trabajo y suegros quienes me impulsaron y ayudaron para la culminación de mi trabajo.

RECONOCIMIENTO

- Agradecer a Dios por permitir concluir mis metas.
- A la Universidad Nacional “Daniel Alcides Carrión” por contribuir durante mi Formación Profesional.
- A la plana de docentes de la Escuela de Agronomía de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- A la Universidad Nacional Agraria la Molina (IBT) Instituto de Biotecnología quienes me brindaron la facilidad para poder ejecutar este proyecto.
- Al Ing. Msc, María Lourdes Tapia y Figueroa por su gran apoyo incondicional y enseñanzas para elaborar la tesis.
- A la Dra. Msc. Edith Zevallos Arias, asesora del Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencia Agropecuarias, de la Escuela de Agronomía, por su acertada recomendación y observación.
- A mis Jurados: Mg. Sc. Andrés Edwin León Mucha, Mg. Manuel Llanos Zevallos, Mg. Fernando James Álvarez Rodríguez. quienes con supervisión y revisión hicieron que este trabajo sea un éxito.
- A todos quienes directa o indirectamente me apoyaron para el desarrollo de mi trabajo de investigación.

RESUMEN

El proyecto intitulado “Multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *in vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*) Para la formación de microbulbillos”. Se instaló en el laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria la Molina, el cual se encuentra a una distancia de 268 km, de la ciudad de cerro de Pasco, a una altitud de 247,3 msnm, longitud 76°57'W y latitud 12°05'S, realizando en el mes de noviembre del 2017 y culminando en el mes de mayo del 2018.

El objetivo formulado para el trabajo fue:

Establecer un protocolo de Multiplicación de plantas mediante el sistema del cultivo *in vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*) para la formación de microbulbillos.

Diseño experimental que se utilizo fue el de DCA con arreglo factorial de 2x3 de 2 tratamientos M1 y M2 y con 3 variedades de ajos Burranquino, Napuri, Blanco Huaralino, se determinó el tratamiento adecuado para la desinfección de meristemas de ajos obteniendo plántulas con crecimiento en *in vitro*, también se evaluó la respuesta de los dos medios de cultivo utilizados M1 Gamborg, Miller y Ojima (1968), y M2 Murashige y Skoog modificado de (IBT 2015). Se evaluó en la etapa de desinfección el porcentaje de contaminación y sobrevivencia, el mejor resultado obtenido fue el T3 con 92% de desinfección. La evaluación en la etapa de multiplicación para la formación de microbulbillos; El mejor resultados durante las evaluaciones de las variables fue el M2 de Murashige y Skoog modificado de (IBT 2015) compuesto de 4 tipos de medios de cultivo que fueron: Inicio, Proliferación, Pre Bulbeo y Bulbeo. En conclusión, se estableció un protocolo de introducción y multiplicación *in vitro* para la formación de microbulbillos de ajos (*Allium sativum. L*)

Palabras clave: Meristemas, desinfección, introducción, multiplicación *in vitro*, inicio, proliferación, bulbeo, pre bulbeo, Ajos (*Allium sativum. L*)

ABSTRACT

The project entitled "Multiplication of plants by in vitro cultivation system of three varieties of garlic (*Allium sativum*. L) For the formation of microbulbs". It was installed in the laboratory of the Institute of Biotechnology (IBT) of the Universidad Nacional Agraria la Molina, which is located at a distance of 268 km, from the city of Cerro de Pasco, at an altitude of 247.3 meters above sea level, length 76 ° 57'W and latitude 12 ° 05'S, taking place in the month of November 2017 and culminating in the month of May 2018.

The objective formulated for the work was:

Establish a protocol for plant multiplication through the in vitro cultivation system of three varieties of garlic (*Allium sativum*. L) for the formation of microbulbs.

The experimental design that was used was the DCA with a 2x3 factorial arrangement of 2 treatments M1 and M2 and with 3 varieties of garlic Burranquino, Napuri, Blanco Huaralino, the appropriate treatment for the disinfection of garlic meristems was determined, obtaining seedlings with growth in vitro, the response of the two culture media used M1 Gamborg, Miller and Ojima (1968), and M2 Murashige and Skoog modified from (IBT 2015). The percentage of contamination and survival were evaluated in the disinfection stage, the best result obtained was T3 with 92% disinfection. The evaluation in the multiplication stage for the formation of microbulbs; The best results during the evaluations of the variables was the M2 of Murashige and Skoog modified from (IBT 2015) composed of 4 types of culture media that were: Start, Proliferation, Pre Bulbeo and Bulbeo. In conclusion, an in vitro introduction and multiplication protocol was established for the formation of garlic microbulbs (*Allium sativum*. L)

Keywords: Meristems, disinfection, introduction, in vitro multiplication, initiation, proliferation, bulbous, pre bulbous, Garlic (*Allium sativum. L*)

INTRODUCCION

El ajo (*Allium sativum. L*), especie entre las plantas más antiguamente que es consumido 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).

En el Perú es considerado una hortaliza importante por las excelentes cualidades para la salud y gastronomía, por este motivo dentro de la Comunidad Andina se ha incrementado la superficie para su producción (MINAG 2008). La mayor zona de producción es Arequipa con 13 TM/ha, seguida de Lima con 6.7 TM/ha y Cajamarca con 5.2 TM/ha. (Nicho *et al.* 2005). El ajo, aunque es una planta anual, presenta la limitante de que sólo se reproduce de forma asexual (Conci & Vilmas 1991); esto lleva a que, en ciclos sucesivos de cultivo, se produzca una acumulación del inóculo y también donde la única vía de propagación es mediante bulbillos o “dientes” lo cual favorece el desarrollo de muchos patógenos como, hongos, bacterias y principalmente virus; ocasionando la reducción de los rendimientos y la calidad, en consecuencia, pérdidas económica, hasta un 52% con una difícil selección posterior al material sano, lo que explica la importancia del desarrollo de eficientes técnicas de saneamiento, conservación y multiplicación de germoplasmas para obtener semilla sana de alta potencia de calidad.

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).

La propagación *in vitro* del ajo se realiza por vitroplantas y microbulbos. Este último proporciona un medio ideal para producir y conservar material limpio, Ya que una ventaja del cultivo *in vitro* es que, en condiciones asépticas, a partir de un pequeño segmento inicial de tejidos es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre. Que puede permitir el inicio de programas de producción de “semillas” certificadas (Pateña *et al.*, 1998). No obstante, el éxito en la bulbificación, depende altamente de la concentración de los reguladores de crecimiento, y de sacarosa, entre otros (Mohamed -Yasseen *et al.*, 1995), lo que implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos (Zel *et al.*, 1997).

Durante la propagación por esta vía muchas plantas detienen su crecimiento o mueren como resultado de la extrema deshidratación que ocurre cuando las plantas son transferidas desde el laboratorio hacia el invernadero. Los bulbillos de ajo producidos *in vitro* podrían ser más resistentes a la deshidratación que en el caso de las plantas con follaje (Mohamed -Yasseen *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se propone contribuir en el desarrollo de un protocolo para la introducción y multiplicación rápida para formación de bulbos de ajos empleando la propagación *in vitro*

ÍNDICE

Pág.

DEDICATORIA

RECONOCIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCION

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FOTOS

CAPITULO I

PROBLEMAS DE INVESTIGACION

1.1. IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3.1 Problema general	2
1.3.2. Problemas específicos	2
1.4. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS	2
1.4.1. Objetivo general	2
1.4.2. Objetivo específicos	3
1.5. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.6. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN	4

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES DE ESTUDIO	5
-----------------------------------	---

2.2. BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS	8
2.2.1. Origen	8
2.2.2. Clasificación Taxonómica	9
2.2.3. Morfología de la planta	9
2.2.4. Plagas y enfermedades	10
2.2.5. Variedades	11
2.2.5.1. Características de las variedades en estudio	12
2.2.6. Propiedades	13
2.2.7. Condiciones Agroclimáticas.....	13
2.2.7.1. Clima	14
2.2.7.2. Suelo	14
2.2.7.3. Agua	15
2.2.8. Zonas Productoras	15
2.2.9. Cultivo de Tejidos	16
2.2.9.1. Micropropagación	16
2.2.9.2. Etapas del cultivo de tejidos	17
2.2.9.3. Ventajas de la micropropagación	18
2.2.9.4. Inconvenientes y límites de la multiplicación	18
2.2.9.5. Factores que influyen en la micropropagación.....	19
2.2.9.6. Reguladores de crecimiento	24
2.2.9.7. Vitaminas.....	29
2.2.9.8. Compuestos Nitrogenados.....	30
2.2.9.9. Sustancias Orgánicas	30
2.2.9.10. Endospermo de Coco.....	30
2.2.9.11. Carbón Activado.....	31

2.2.9.12. Cantidad de medios de cultivo	31
2.2.9.13. Esterilización	32
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	32
2.4. FORMULACION DE LA HIPOTESIS	33
2.4.1. Hipótesis general	33
2.4.2. Hipótesis específicas	33
2.5. IDENTIFICACION DE VARIABLES	33
2.6. DEFINICION OPERACIONAL DE VARIABLES E INDICADORES	34

CAPITULO III

METODOLOGIA Y TECNICAS DE INVESTIGACION

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	35
3.2. MÉTODO DE INVESTIGACION	35
3.3. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	35
3.3.1. Diseño experimental	35
3.3.2. Modelo Estadístico:	35
3.3.3. Análisis de Varianza (ANVA)	36
3.4. POBLACION Y MUESTRA	36
3.4.1. Distribución de los tratamientos	37
3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	38
3.6. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	38
3.7. TRATAMIENTO ESTADISTICO	39
3.8. SELECCIÓN, VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DE LOS INSTRUMENTOS DE INVESTIGACION	39
3.9. ORIENTACIÓN ÉTICA	39

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO.....	40
4.1.1. Materiales y equipos.....	40
4.1.2. Tratamientos	42
4.1.3. Descripción de los tratamientos	46
4.1.4. Evaluación de las variables	51
4.2. PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	52
4.2.1. Tratamiento de Desinfección.....	52
4.2.2. Supervivencia de Explantes.....	54
4.2.3. Altura de planta a los 30 días para el establecimiento	56
4.2.4. Número de Hojas a los 30 días de establecimiento	60
4.2.5. Número de Microbulbillo por planta.....	63
4.2.6. Número de Hojas	66
4.2.7. Longitud de Vitroplantas	68
4.2.8. Diámetro de microbulbillos.....	72
4.2.9. Peso de microbulbillos	74
4.2.10. Número de Raíces	77
4.3. PRUEBA DE HIPÓTESIS	81
4.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	81

INDICE DE CUADROS

Cuadro 01: Condiciones de clima y suelo en las zonas productoras de Ajos del Perú	15
Cuadro 02: Diversos efectos de las hormonas y reguladores de crecimiento	29
Cuadro 03: Tratamientos de desinfección.....	42
Cuadro 04: Composición del medio de Gamborg Miller y Ojíma (1968) para la fase de Multiplicación de las tres variedades de ajos para la formación de Micro Bulbillos	43
Cuadro 05: Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog modificado (1962) IBT (2015), para la fase de multiplicación de las tres variedades de ajos para la formación de micro bulbillos.....	44
Cuadro 06: Porcentaje de desinfección de explantes de ajos	52
Cuadro 07: Sobrevivencia de los explantes de las tres variedades de ajos	55
Cuadro 08: ANOVA para altura de planta de las tres variedades de ajos a los 30 días de establecimiento.....	57
Cuadro 09: ANOVA de los efectos simples de la interacción M x V para la altura de planta a los 30 días de establecimiento.....	57
Cuadro 10: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para altura de planta de las tres variedades de ajos a los 30 días de establecimiento, según Tukey al 5% de probabilidad.....	58
Cuadro 11: ANOVA para número de hojas a los 30 días fase de establecimiento	60
Cuadro 12: Prueba de significación de medias de los Medios de cultivo para el número de hojas a los 30 días fase de establecimiento, según Tukey al 5% de probabilidad. ...	61
Cuadro 13: ANOVA para número de microbulbillos por planta	63
Cuadro 14: ANOVA de los efectos simples para número de microbulbillos por planta de las tres variedades de ajos	64

Cuadro 15: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para número de microbulbillos por planta de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad	64
Cuadro 16: ANOVA para número de hojas por planta	66
Cuadro 17: Prueba de significación de medias de las variedades para número de hojas, según Tukey al 5% de probabilidad.....	67
Cuadro 18: ANOVA para longitud de vitroplantas	68
Cuadro 19: ANOVA de los efectos simples para longitud de vitroplantas de las tres variedades de ajos	69
Cuadro 20: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para longitud de vitroplantas de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad	70
Cuadro 21: ANOVA para diámetro de microbulbillos	72
Cuadro 22: ANOVA de los efectos simples para diámetro de microbulbillos de las tres variedades de ajos	72
Cuadro 23: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para diámetro de microbulbillos de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad	73
Cuadro 24: ANOVA para peso de microbulbillos	74
Cuadro 25: ANOVA de los efectos simples para peso de microbulbillos de las tres variedades de ajos	75
Cuadro 26: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para peso de microbulbillos de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad	76
Cuadro 27: ANOVA para número de raíces por vitroplantas	77

Cuadro 28: ANOVA de los efectos simples para número de raíces por vitroplantas de las tres variedades de ajos.....	78
Cuadro 29: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para número de raíces por vitroplanta de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad	79

INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Esquema corte longitudinal de un diente de ajo.	47
Figura 02: Tasa de Desinfección	53
Figura 03: Porcentaje de sobrevivencia de las tres variedades de ajos con tratamiento	55
Figura 04: Gráfico de barras de altura promedio de las 3 variedades de ajos a los 30 días en fase de establecimiento	59
Figura 05: Comparaciones de número de hojas en los medios M1 y M2	61
Figura 06: Gráfico de barras de Número de Hojas promedio de las Tres Variedades de Ajos a los 30 días de establecimiento	61
Figura 07: Grafico de barras de número de microbulbillos por planta de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2	65
Figura 08: Comparaciones de número de hojas por planta.....	67
Figura 09: Grafico de barras de número de hojas por planta de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2	68
Figura 10: Grafico de barras de longitud de vitroplantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2	71
Figura 11: Grafico de barras de diámetro de microbulbillos por plantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2	74
Figura 12: Grafico de barras de peso de microbulbillos por plantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2	76
Figura 13: Grafico de barras de numero de raíces por vitroplantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2	79

INDICE DE ANEXOS

Matriz de Consistencia.....	98
Sales Minerales de Murashige y Skoog (1962)	21
Sales Minerales de Gamborg Miller y Ojima (1968)	22
Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M1 (Barranquino)	23
Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M1 (Napuri)	23
Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M1 (Blanco Huaralino)	24
Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M2 (Barranquino)	24
Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M2 (Napuri)	25
Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M2 (Blanco Huaralino)	25
Foto 01: Semillas de las tres variedades de ajos	26
Foto 02: Introducción de los explantes	27
Foto 03: Corte de plántulas de ajos	27
Foto 04: Meristemas de ajos expuestos	27
Foto 05: Meristemas listos para la siembra.....	28
Foto 06: Meristemas sembrados	28
Foto 07: Meristemas en crecimiento	28
Foto 08: Plántulas de ajos ya diferenciados	29
Foto 09: Plántulas en etapa de pre bulbeo	30
Foto 10: Plántulas de ajos en etapa de pre bulbeo en agitación Shakers	30
Foto 11: Plántulas en etapa de Bulbeo	30
Foto 12: Plántulas de ajos bulbeados y enraizados	31
Foto 13: Plántulas de ajos Barranquino	31
Foto 14: Plántulas de ajos con microbulbillos formados Barranquino	31

Foto 15: Cosecha de plántulas de ajos con microbulbillos formados variedad Barranquino	32
Foto 16: Plántulas de ajos variedad Napuri en etapa de bulbeo.....	32
Foto 17: Plántulas de ajo variedad Blanco Huaralino en etapa de bulbeo	33
Foto 18: Plántulas de ajo de las tres variedades cosechados.....	33
Foto 19: Evaluación de plántulas de ajos cosechados.....	34
Foto 20: Longitud y peso de plántulas de ajos cosechado	34
Foto 21: Balanza Analítica y Bernier para evaluaciones	34

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Identificación y Determinación del Problema

El ajo (*Allium sativum. L*), especie entre las plantas más antiguamente que es consumido 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).

En el Perú es considerado una hortaliza importante por las excelentes cualidades para la salud y gastronomía, por este motivo dentro de la Comunidad Andina se ha incrementado la superficie para su producción (MINAG 2008). La mayor zona de producción es Arequipa con 13 TM/ha, seguida de Lima con 6.7 TM/ha y Cajamarca con 5.2 TM/ha. (Nicho *et al*, 2005),

Uno de los principales dificultades nacionales a la producción de ajos lo constituyen los `problemas fitosanitarios, atribuidos de gran parte a la naturaleza orgánica de las especies, en donde la única vía de propagación es mediante bulbillos o “dientes” la cual favorece el desarrollo de enfermedades en el cultivo

(nematodos, hongos, bacterias y virus) provocando una importante disminución en la producción llegando a producir hasta un 52% y una difícil selección posterior de material sano, lo que explica la importancia del desarrollo de eficientes técnicas de saneamiento, conservación y multiplicación de germoplasmas para obtener semilla sana de alta potencia de calidad, de esta manera las técnicas de cultivo *in vitro* son importantes herramientas para obtener semillas de sanidad controlada

1.2. Delimitación de la Investigación

El experimento se realizó en la Universidad Nacional Agraria la Molina, en el Área de Cultivo de Tejidos del laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT), departamento de Lima, a una altitud de 247 msnm, longitud 76°57W y latitud 12°05'S, la duración del experimento fue de 5 meses durante el 2018

1.3. Formulación del Problema

1.3.1 Problema general

¿Cómo establecer la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *in vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum?* L) Para la formación de microbulbillo?

1.3.2. Problemas específicos

¿Cómo determinar el mejor medio de cultivo para la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *in vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum?* L) para la formación de microbulbillos

1.4. Formulación de Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Establecer la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *In Vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*) para la formación de Microbulbillos

1.4.2. Objetivo específicos

- Determinar el mejor medio de cultivo para la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo in vitro de tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*) para la formación de microbulbillos
- Evaluar la efectividad de los medios de propagación in vitro de las 3 variedades de ajos (*Allium sativum. L*) para la formación de microbulbillos

1.5. Justificación de la Investigación

El ajo, aunque es una planta anual, presenta la limitante de que sólo se reproduce de forma asexual (Conci & Vilmas 1991); esto lleva a que, en ciclos sucesivos de cultivo, se produzca una acumulación del inóculo y también donde la única vía de propagación es mediante bulbillos o “dientes” lo cual favorece el desarrollo de muchos patógenos como, hongos, bacterias y principalmente virus; ocasionando la reducción de los rendimientos y la calidad, en consecuencia, pérdidas económica, hasta un 52% con una difícil selección posterior al material sano, lo que explica la importancia del desarrollo de eficientes técnicas de saneamiento, conservación y multiplicación de germoplasmas para obtener semilla sana de alta potencia de calidad.

La propagación *in vitro* de ajos es de mucha importancia ya que este cultivo está ligado a sus tradiciones y a las condiciones arcaicas, por lo que es necesario buscar mayores conocimientos científicos de su propagación con miras a un desarrollo sostenido de la agricultura.

El presente trabajo de investigación desde el aspecto científico y tecnológico permitirá proporcionar mayor conocimiento sobre cómo obtener plántulas en poco tiempo mediante el cultivo *in vitro*, plántulas libres de enfermedades (hongos, bacterias), y además de propagar masivamente material vegetal sano en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria.

Frente a estos hechos en el aspecto económico y social al mejorar la calidad de propagación de ajos de diferentes variedades con técnicas de cultivo de tejidos repercutirá en mejorar la producción y por tanto la calidad de vida del productor.

1.6. Limitaciones de la Investigación

El ajos (*Allium sativum. L*), es una especie importante, pero la falta de instituciones para patrocinar las investigaciones en cultivo en *in vitro* son escasas o no cuentan con suficiente presupuesto y equipos para la realización de la investigación.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes de Estudio

Shilderentscheler y schmindiche (1984), menciona que el cultivo de tejidos es una herramienta de gran utilidad en la biotecnología. Esta técnica se basa en la “totipotencialidad celular”, capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa bajo ciertas condiciones químicas y físicas, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se obtiene la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original a partir de cualquier parte aislada de la planta, sean estos trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. Inicialmente se usó esta técnica para la multiplicación masiva de plantas elites o micro propagación y también en la obtención de clones libres de virus.

FAO (1990), manifiesta que el cultivo *in vitro* llamado también micro propagación se define como cultivo de células, tejidos u órganos de plantas en condiciones asépticas; por ser eficiente y practico ofrece muchas ventajas haciendo posible la producción de semillas libre de enfermedades virósicas en menor tiempo.

Escalante (1988), explica que el tamaño del explante es un aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos, existe un tamaño mínimo del 3 explantes variable según el material vegetal por debajo del cual se obtienen proliferación callosa.

Rusell (1986), a partir de este momento las células o tejidos se comportarán de diferente forma dependiendo de los factores físicos, pero principalmente del tipo de nutrientes y de las concentraciones de los reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas) presentes en el medio.

Mejía (1994), el uso de semillas botánica de material genético de las plantas domésticas es para aplicar la liberación de variedades comerciales implica también los métodos del cultivo *in vitro* de órganos, tejidos y células vegetales. Hoy en día la manipulación genética y la utilización *in vitro* constituye una estrategia en los programas de mejoramiento.

En La Estación Experimental Agraria Donoso - Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), se realizó un trabajo de investigación en la determinación de efectos de un medio de cultivo modificado usando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento de (auxinas/citoquininas) para la regeneración y multiplicación *in vitro* del ajo (*Allium sativum. L*) variedad Barranquino. Obteniendo un 60 % porcentaje de brotes.

Pardo *et al.*, (2011), establecieron un protocolo para la regeneración de plantas a partir de segmentos de hojas y raíces. Determinaron el efecto de la combinación de auxinas y citoquininas, así como la influencia del tipo de explante y su posición en la microplanta sobre la inducción de callos y su posterior regeneración a brotes.

Los explantes extraídos de la sección apical de las raíces favorecieron la regeneración de callos, en comparación con segmentos basales de las hojas.

Mujica y Mogollón (2004), estimularon la bulbificación *in vitro* de ajo morado con la adición de citoquininas y sacarosa. Así mismo, Mujica *et al.*, (2008), indujeron la bubificación *in vitro* del ajo morado, posteriormente realizaron estudios histológicos con el propósito de conocer el origen de los órganos regenerados y cambios anatómicos.

Izquierdo y Gómez (2010), seleccionaron genotipos de ajo de más alto rendimiento, del cual el genotipo criollo-3 fue saneado de los virus que afectan al cultivo en la Habana y propagado *in vitro*. El clon mostró un buen comportamiento agronómico a las plagas, un elevado rendimiento y buena calidad de la semilla.

En los ensayos sobre conservación *in vitro* de ajos realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP (Torres *et al.*, 2007). Muestran Otro aspecto a tener en cuenta, que es disminuir en las plantas micropropagadas la incidencia de la hiperhibrididad, desorden fisiológico al que las *Alliaceae* muestran susceptibilidad, y que se ha observado con frecuencia.

Conci y Colaboradores (2007), han podido detectar que la multiplicación no es homogénea para todos los clones, ya que algunos lo hacen en mayor cantidad que otros. Por otra parte, también se ha comprobado que la tasa de multiplicación varía con el número de repiques en el medio de multiplicación (siendo baja en los primeros y aumentando a partir del segundo o tercer repique a medio fresco) y dependiendo de los cultivares y del tiempo de permanencia en las condiciones *in vitro*.

El Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), con el apoyo del Fondo Especial para la Educación Superior (FEES), ha desarrollado diversas investigaciones

referentes a este cultivo, alcanzando temas como la identificación de agricultores, zonas de cultivo, identificación de virus, análisis moleculares y el establecimiento de un protocolo *in vitro* para la multiplicación masiva. Este último tópico es relevante debido a la importancia de los agricultores en la obtención de semilla de alta calidad y en las cantidades necesarias para los diferentes sectores hortícolas del país. Sin embargo, para desarrollar procesos de propagación *in vitro* del ajo, cada país emplea materiales autóctonos y en cada caso los materiales vegetales responden de manera diferente a las desinfecciones y a los medios de cultivo, ya que la obtención del número de plantas depende de la especie utilizada y/o las condiciones del medio de cultivo. Es por ello que resulta necesario considerar todos los factores que afectan el crecimiento para alcanzar incrementos exponenciales, como son la evaluación, el ajuste y la optimización de los protocolos con respecto a la zona en la que se esté trabajando (Castillo, 2004).

2.2. Bases Teóricas Científicas

2.2.1. Origen

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 (Kazajastán, Uzbekistán y Turmenistán), 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 (Mc Collum, 1976; Cabrera y Elliot, 1996), se introdujo en América por los conquistadores españoles probablemente a través de México, desde donde fue diseminado hasta Chile por el Sur y posteriormente fue introducido en el hemisferio Norte, donde constituye en la actualidad un cultivo de importancia económica (FAO, 1988).

El nombre romano del ajo es (*Allium sativum*) proviene del latín y quiere decir cultivado (Cabrera y Elliot, 1996), es una especie que depende de las condiciones termo fotoinductoras y se encuentra distribuida desde el Ecuador hasta los 400LS y desde el nivel del mar hasta los 3 700 m.s.n.m., lo que demuestra su amplia capacidad de adaptación (Burba, 1992).

2.2.2. Clasificación Taxonómica

Es una planta diploide $2n=16$, herbácea constituida por un bulbo subterráneo, formado por "dientes" unidos en su base alrededor del tallo verdadero y recubiertos por catafilos blancos o morados, cuya tonalidad varía según la variedad y la altura del sitio de siembra (Burba, 2003).

Reino: Planta

División: Magnoliophyta

Clase: Lilopsida

Orden: Asparagales

Familia: Alliaceas

Sub Familia: Alliaecae

Tribu: Allieae

Género: *Allium*

Especie: *Allium sativum*

2.2.3. Morfología de la planta

Minag (2010), presenta la siguiente morfología.

A) Planta

Familia de la cebolla de 1.5 m de altura Plantas perennes cultivadas como anuales, apomicticas y con bulbos compuestos de dientes, de 3-6 cm de

diámetro, con cada diente tunicado y con una envoltura común blanquecina.

B) Hojas

Hojas planas y delgadas de unos 6 x 1-3 cm, con el ápice agudo y de color verde glauco de hasta 30 cm de longitud desde 8mm de anchura

C) Flores

Verdosas o blanquecinas, a veces rosadas, muy poco abundantes (algunas veces inexistentes) que sobresalen con un largo pedúnculo sobre su cabezuela de bulbillos. Etapa mucha más larga que la cabezuela.

D) Bulbo

De piel blanca, forma una cabeza dividida en gajos que comúnmente son llamados dientes. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 dientes,

2.2.4. Plagas y enfermedades

Minag (2008), describe las siguientes plagas y enfermedades.

A. Plagas

- Mosca de la cebolla (*Phorbia antiqua* Meig).

Ataca a las flores, órganos verdes. El ápice de la hoja palidece y después muere.

- Tiña del ajo y de la cebolla (*Lita alliella*).

Abre galerías en bulbos y hojas. Primero atacan a las hojas después bulbos. Las plantas se amarillean y mueren.

- Polilla (*Laspeyresia nigricana* Steph).

Causan daños al penetrar las orugas por el interior de las vainas de las hojas hasta el cogollo.

- Nemátodos (*Ditylenchus dipsaci* Kuehn)

Escaso desarrollo de las plantas afectadas y en casos graves la muerte de las mismas.

B. Enfermedades

- Mildiu (phytophthora infestans).

Manchas en hojas, tallos y frutos (en el caso de plantas cultivadas para la obtención de frutos, como tomate, pimiento, etc.). Dichas manchas son de color pardo oscuro (necróticas) de forma irregular, pero por lo general redondeadas. Aparecen en el envés de la hoja. Si las condiciones ambientales le son favorables (humedad-temperatura), su desarrollo es vertiginoso, acabando en numerosas ocasiones con la planta.

- Roya (*Puccinia allii*, *P. porri*).

Frecuentemente aparecen los primeros síntomas a principios de mayo. Origina manchas pardo-rojizas que después toman coloración violácea. Las hojas se secan prematuramente como consecuencia del ataque.

- Peronospora schaleideni.

Vellosidad blanquecina en hoja, que amarillea y muere rápidamente. Como consecuencia de ella suele aparecer el mildiu.

- Botrytis o moho gris (*Botrytis cinerea*).

Ataca a tallos, hojas y algunas veces al fruto por la zona peduncular.

2.2.5. Variedades

Blanco común (envoltura de dientes plateada, tardío, se consumen secos).

Rosa temprano (envoltura de dientes rosácea, se consumen tiernos, precoz).

Rojo (envoltura roja, la pigmentación pasa a los dientes de color rojo, dientes gruesos y cortos, más precoces que los blancos).

2.2.5.1. Características de las variedades en estudio

INIA (2004), presenta la siguiente descripción de las tres variedades de ajos en estudio.

A. Variedad Blanco Huaralino

Ajo blanco o común. Es el ajo más consumido en los hogares ya que resulta en seco un condimento ideal para numerosas recetas por su intenso sabor y aroma persistente. Su color exterior es blanquecino, y los dientes se distribuyen de forma aislada. Se puede conservar sin necesidad de nevera durante un gran período de tiempo. Su tamaño es mayor que el resto de tipos, pudiendo alcanzar diámetros de 10-12 cm.

Llamado también Huaralino son rústicos, de buena productividad y conservación. Suelen consumirse secos.

B. Variedad Napuri

Napurí (color violáceo) y que se cultiva en Majes (Arequipa), cañete y Barranca (Lima). Sus bulbos tienen menos de 20 dientes con un diámetro promedio de 40 milímetros y un período vegetativo de 5 meses.

La parte utilizada del ajo es el bulbo, que está formado por unos 10-12 bulbillos o “dientes”, de forma ovoide y algo arqueada, rodeados por una túnica membranosa. Los tallos, terminan en una umbela de flores blancas o rojizas. Cuando los bulbos están

intactos su olor es muy poco, pero al cortarlos desarrollan inmediatamente un olor intenso, característico.

C. Variedad Barranquino

La variedad Morado Barranquino presenta un periodo vegetativo de 5,5 a 6 meses, nativo de la localidad de Barranca (Norte de Lima), presenta las mejores características comerciales de bulbo, (circular perfecto), con bajo número de dientes, compactos, homogéneos (máximo 13 – 14), las túnicas tienen una coloración morada a rosada

2.2.6. Propiedades

MINAG (2010), el ajo es muy rico en sales minerales, azufre, encimas y vitaminas, por sus propiedades terapéuticas se le aprovecha en las ramas industriales, alimentaria y farmacéutica

- Ayuda a combatir un buen número de hongos, bacterias y virus
- Reduce la presión arterial y el colesterol
- Ayuda a reducir el bloqueo de las arterias y reparar daños causados por la arteriosclerosis
- Actúa como antiinflamatorio
- Reduce los niveles de azúcar en la sangre
- Ayuda a combatir el estrés y la depresión
- Ayuda en casos de reumatismo, hidropesía, edemas y vejiga

2.2.7. Condiciones Agroclimáticas

MINAG (2012), describe las siguientes condiciones agroclimáticas.

2.2.7.1. Clima

Luminosidad en la primera fase de desarrollo desde que comienza a formarse el bulbo hasta la cosecha. Cuando la planta no ha estado sujeta a bajas temperaturas puede que no se forme bulbo, aun cuando los días sean largos. Una humedad relativa por debajo del 60% y la ausencia de precipitaciones favorecen la presencia de pulgones y trips.

Las altas temperaturas, la baja humedad y la ausencia de lluvia durante la cosecha garantizan un buen curado. La interacción entre la temperatura y el fotoperiodo inducen a la bulbificación. Evidencias experimentales muestran que cuanto mayor es la cuota de frío recibida, menor es el requerimiento de fotoperiodo y la bulbificación se induce con días de umbral más cortos. Las altitudes van desde los 600 a los 3.500 m.s.n.m. Se adapta en lugares con temperaturas que oscilan entre 10 y 34 °C, siendo la media óptima de 18 °C

2.2.7.2. Suelo

Requiere suelos profundos y fértiles, suelos francos arcillosos de buen drenaje, con pH cercano a 5,5; la aplicación de materia orgánica debe ser, estiércol de 15 a 30 t/ha. Hay que tener muy en cuenta la fertilidad ya que ajos morados (Arequipeño y Barranquino) con alta fertilidad del suelo tienden a no formar bulbo y se ramalean o hay un brotamiento prematuro de los dientes de culminar el periodo vegetativo.

2.2.7.3. Agua

El ajo requiere buena humedad en el suelo durante la emergencia. Eso no significa abusar de ella, puesto que el exceso puede provocar lavado de nutrientes y causar muerte de raíces por asfixia y por consiguiente ingreso de patógenos. Una buena provisión de agua permite buen crecimiento y vigor, esto desfavorece el ataque de enfermedades como raíz rosada y podredumbre blanca (ambas por falta de agua).

2.2.8. Zonas Productoras

MINAG (2014), en el Perú se producen ajos durante todo el año, para su exportación se debe tener en cuenta que los consumidores prefieren el ajo fresco y los restaurantes y productores farmacéuticos y de alimentos prefieren ajos congelados.

El Promedio de rendimientos fue de la siguiente manera: Arequipa con 14 t/ha, Ica con 11.8 t/ha y La Libertad 9 t/ha, Ayacucho 7.5 t/ha, Junín, 5.3t/ha

Cuadro 01: Condiciones de clima y suelo en las zonas productoras de Ajos del Perú

Zonas productoras de ajo		Altitud (msnm)	Suelo		clima	
			PH	MO (%)	T° MED	P° (mm/año)
Arequipa	Tambo	21.-3500	Neutro	1.7	19.2	< 0.5
	Caylloma (majes)	1400.0	Neutro	1.9	19.2	< 0.5
Lima	Barranca	49.0	Neutro	2.1	21.4	7.0
	Cañete	150.0	Neutro	1.9	20.4	11.4
	Chao	64.0	Neutro	1.8	18.9	22.0

La libertad	Viru	25.0– 68.0	Neutro	2.0	21.7	10.8
Ayacucho	Huanta	2628.0	Neutro	1.6	16.4	490.0
Junín	Tarma	3050.0	Neutro	1.8	12.5	383.5
	Jauja	3370.0	Neutro	2.1	12.2	757.8

Neutro (PH 6.8- 7.1)

Fuente: MINAG (2014).

2.2.9. Cultivo de Tejidos

El cultivo de tejidos *in vitro*, es un grupo heterogéneo de técnicas, mediante las cuales un explante, cualquier parte separada de una planta, células, tejidos, embriones, etc. con potencial de diferenciación puede ser cultivado bajo condiciones asépticas, en presencia de un medio de cultivo constituido por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y fitohormonas que se incuban en condiciones controladas. esta técnica de cultivo aséptico se basa fundamentalmente en el principio de totipotencialidad, que establece que cualquier célula somática joven o en proceso de diferenciación tiene una alta capacidad o potencialidad para regenerar una planta completa si se colocan en condiciones controladas y adecuadas (Luna, 2002).

2.2.9.1. Micropropagación

La micropropagación es un procedimiento que consiste en el cultivo bajo condiciones asépticas de órganos, tejidos, células o protoplastos en un medio de cultivo artificial para lograr el desarrollo y producción de plantas completas *in vitro*. Es también una de las aplicaciones del cultivo de tejidos donde ha habido más avances y es aplicada comercialmente a un mayor número de especies (Barba *et al.*, 2001).

El cultivo *in vitro* se utiliza cada vez más para la propagación de especies amenazadas en peligro de extinción, con el fin de aumentar rápidamente el número de individuos, superar problemas de fertilidad y de biología reproductiva, así como proporcionar material para su reintroducción en la naturaleza y contribuir a la conservación de la diversidad a mediano y largo plazo (Pedroza, 2008).

Además, la micropropagación de plantas leñosas a través del cultivo de tejidos ha sido lograda en varias especies de frutales cultivadas con el fin de multiplicar genotipos de interés (Pedroza, 2008).

2.2.9.2. Etapas del cultivo de tejidos

Murashige (1974), encontró que era más útil descartar la secuencia de eventos relacionados con la micropropagación de plantas, de las siguientes maneras.

- Etapa 0: etapa inicial, de selección de la planta madre y modalidad de pre tratamiento o introducción bajo condiciones asépticas se realizan estudios con pruebas serológicas debido a que pueden ser portadoras de enfermedades endófitas que pasan desapercibidas y luego se vuelven un problema en la etapa de la multiplicación.

También es fundamental el conocimiento de su identidad genética, así como su vigor y sanidad. Ya que son requisitos básicos para la obtención de cultivares confiables

- Etapa I: establecimiento aséptico del explante es el cual se establece el cultivo inicial o primario
- Etapa II: multiplicación de brotes, crecimiento de las plántulas
- Etapa III: enraizamiento o pre trasplante
- Etapa IV: aclimatación (Villalobos y Thorpe 1991; Mejía, 1994).

2.2.9.3. Ventajas de la micropropagación

Según Mejía (1994)

- ✓ Otorga la posibilidad de incrementar rápidamente nuevos materiales.
- ✓ Permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperaturas y humedad controlada).
- ✓ Permite estudiar diversos procesos fisiológicos.
- ✓ Evita el riesgo de que proliferen agentes patógenos porque la micro propagación se realiza en medios esterilizados.
- ✓ Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.
- ✓ Permite la obtención de individuos uniformes
- ✓ Facilita el transporte del material.

2.2.9.4. Inconvenientes y límites de la multiplicación

Aguirre, Pierre y Leigue, (2010), cita entre las desventajas de la micropropagación

- ✓ Estabilidad genética débil en algunos sistemas de propagación *in vitro*

- ✓ No todas las especies responden igual al cultivo *in vitro*
- ✓ Cada especie requiere de métodos particulares de cultivo *in vitro*
- ✓ Aclimatación En las plantas cultivadas, la propagación por clones favorece la acumulación de virus. La mayor parte de los fenómenos de degeneración (frecuentes en la papa, fresa, frambuesa, y muy numerosas plantas multiplicadas por clonación) son atribuibles a virus latentes a Microplasma.
- ✓ Por otra parte, debemos señalar que, para remediar este inconveniente de la multiplicación vegetativa, se acude frecuentemente al cultivo de meristemos (eventualmente asociado a la termoterapia), es decir a otro método de multiplicación (micro esquejado *in vitro*).

2.2.9.5. Factores que influyen en la micropropagación

A. Planta donante del explante.

El estado fisiológico de la planta utilizada como explante influye significativamente en su capacidad morfogénica, Roca y Mroginski (1991), cita a Styer *et al.* (1983) e indican que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas.

Asimismo, Villalobos *et al.* (1980) citado por Roca y Mroginski (1991) mencionan que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis.

B. Explante

Montoya (1991) recomienda tomar en cuenta el tamaño, la fuente y la edad fisiológica del explante. A medida que se aumenta el tamaño del explante se disminuye la posibilidad de lograr el objetivo de liberación viral a medida que se disminuye el tamaño, la posibilidad de establecer el cultivo y alcanzar la morfogénesis es menor. Los tejidos más jóvenes y menos diferenciados son en general los del mayor éxito en cultivo de tejidos. Para cultivos arbóreos, los callos pueden iniciarse solamente a partir de tejidos juveniles.

En caso de micropropagación a partir de semillas, estas tienen que ser desinfectadas superficialmente y geminar en condiciones de asepsia. En caso de propagación vegetativa, los brotes y los ápices meristematicos han sido generalmente la fuente de los explantes Villalobos (1980) citado por Roca y Mroginski (1991). Existen otros factores que pueden alterar las respuestas de los explantes cultivados, como la época del año en que se realizan los cultivos, los explantes obtenidos de invernadero o campo, los pretratamientos a los explantes y las condiciones de crecimiento de las plantas donantes de los mismos, Roca y Mroginski (1991).

C. Factores Físicos

Che *et al*, (1982), citado por Roca y Mroginski (1991) indican que las temperaturas de la mayoría de las especies fluctúan entre 24° y 28°C, variando los regímenes de temperatura en el día y la

noche, han encontrado que únicamente en un reducido número de especies tal relación es ventajosa.

Villalobos *et al.*, (1980), citado por roca y Mroginski (1991), demostraron que la luz es un factor fundamental en la morfogénesis, en el caso de *Pinus Radiata*, observaron que la luz interacciona con una Citoquinina durante la diferenciación de los brotes adventicios y que la morfogénesis no ocurre cuando falta uno de esos componentes. El factor luz involucra varios componentes como son la importancia morfogenética de estos componentes.

Los factores físicos ambientales influyen en todos los procesos; absorción de agua evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, etc., Roca *et al.* (1991).

D. Asepsia

Esta referida tanto el material vegetal, a los medios recipientes de cultivo, cuartos de cultivo, lugares de transferencia de cultivo, operarios y herramientas con los cuales se manipula los cultivos Montoya (1991).

E. Medios de Cultivo

Es uno de los factores más determinantes del éxito, existen respuestas diferentes de las plantas a cada medio específico, Montoya (1991), indican los requisitos particulares de nutrición y hormonas de una determinada planta.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, los reguladores, vitaminas, en mínimas

concentraciones, regulan la distribución de todo tipo de sustancia en el interior de la planta y, por consiguiente, son responsables de la división celular, las auxinas y citoquininas regulan el desarrollo de los órganos (regeneración) sobre partes de plantas (explantes), cultivadas *in vitro*, Roca y Mroginski (1991)

La elección de las sales inorgánicas y los niveles de sales, están básicamente dictado por los recursos del investigador y las necesidades de la planta de que se trate Montulban (1992), citado por Salinas.

F. Genotipo

Montoya (1991), menciona que algunas plantas resultan ser aptas y logran mejores respuestas en cultivos *in vitro*, las diferencias en la regeneración de plantas son dependientes del genotipo. La constitución genética y factores como temperatura óptima son determinantes para el crecimiento y la floración, forman, color de flores. Esta depende también de las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro*.

G. Efectos de Posición y Competencia

A pesar de considerarse que, en todas las células de un organismo, existe el mismo genotipo, existen fuertes diferencias entre célula y célula y entre distintos tipos de órganos en cuanto a capacidad de regeneración en cultivo de tejidos. Se considera en general que lo tejidos embriogénesis, meristematicos y reproductivos parecen tener una mayor propensión para el

crecimiento y morfogénesis en cultivos de tejidos Montoya (1991).

H. Sub Cultivo

Montoya (1991), menciona que tanto en los callos como en las suspensiones celulares existe una capacidad de proliferación celular indefinida, originando dos fenómenos importantes; la pérdida de potencial morfogénico y variabilidad genética (el fenómeno se ha observado menos pronunciado en cultivo de órganos).

I. Suministro de Oxígeno

El suministro de oxígeno en el medio y el uso de un medio líquido favorecen el enraizamiento, Pierik (1990)

J. Agar

Estudios realizados por Nemeth (1986), citados por Pierik (1990), demostraron que la formación de raíces adventicias es pobre en medios sólidos, en comparación de los medios líquidos. La concentración del agar en cultivos de tejidos vegetales varía de 0.6% a 1.0%, los problemas de mala gelificación se deben principalmente al empleo de un PH bajo; cuando el gel queda muy firme se debe a un PH elevado. Se deben evitar periodos prolongados a altas temperaturas de la autoclave para impedir el deterioro del agar.

K. PH

Según Pierik (1990), se conoce poco acerca de la influencia del PH del medio nutritivo en el cultivo *in vitro*. El rango apto para

el crecimiento está entre 5,0 – 6,5. Un PH menor a 4,5 y un PH mayor a 7, generalmente frena el crecimiento y desarrollo *in vitro*.

2.2.9.6. Reguladores de crecimiento

A. Hormonas

Las sustancias de crecimiento pueden ser endógenas se producen dentro de la misma planta o exógena si se aplican externamente, frecuentemente las sustancias de crecimiento o Fito reguladores sintéticos pueden estimular unos procesos y reprimir otros, del mismo modo, algunas hormonas pueden ser estimulantes a dosis bajas o inhibitorias a dosis altas; el nivel depende de la especie, por otra parte, el proceso puede ser afectado por la administración de una hormona exógena si esta es producida endógenamente en cantidades suficientes, Osorio, (1988).

Según Alvarado (1992), los reguladores de crecimiento, llamadas también hormonas pueden ser origen natural o artificial y se pueden dividir en:

Grupo I: Auxinas

Ácido Indol acético (AIA), Ácido Naftal acético (ANA), ácido Indol Butírico (AIB)-2,4 Dicloro Fenoxiacético (2,4D)

Grupo II: Citoquininas, 6-Bencilaminopurina (BAP), Kinetina (KIN), Zeatina (ZEA), Sulfato de Adenina (SO₄AD)

Grupo III: Acido Giberélico (AG₃)

Grupo IV: retardatorios

Cloruro de Clorocolina (CCC), Hidrozina Malpica (Hm)

Grupo V: Abscísico (ABA) AcidoTrans – cinámico (a-Trans-c)

Grupo VI: Etileno

Los grupos más importantes de hormonas vegetales son las auxinas, las citoquininas y las Giberelinas que pueden actuar solas o combinadas, las hormonales están en función del genotipo y del tipo de tejido utilizado, (Cisneros, 1988 citado por salinas, 1988).

A.1. Auxinas

Mejía (1984) menciona que las auxinas están identificadas por ocasionar elongación del tallo e internudos, tropismo y dominancia apical abscisión y enraizamiento.

Según Pierik (1990), las auxinas producen la elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación d raíces adventicias, inhibición de vástagos axilares y adventicios y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. A bajas concentraciones no se producen rices y tiene lugar a la formación de callos, la utilización del 2,4 – D, puede inducir mutaciones e inhibir la fotosíntesis.

En algunos casos las auxinas interactúan positivamente junto con las citoquininas en la regulación de la división, elongación y diferenciación celular, así como en la formación de órganos Dodds y Roberts (1982), citados por Mejía (1991).

Roca y Mroginski (1991), indican que las auxinas tienen una gran capacidad de producir agrandamiento y alargamiento celular, han encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos, existen Auxinas naturales AIA, indol -3- acetoniitrilo, ácido indol -3-propionico, etilindo -3-acetato, entre otros. Entre las auxinas sintéticas se consideran la 2,4-D, ANA, IBA, las concentraciones más usadas son 0.001 a 10 mg-7litro, 0.1 a 10 mg/litro y 1 a 10 mg/litro con un punto óptimo de 0.1 a 1 mg/litro, 1 a 5 mg/litro y 2 mg/litro, para el AIA, 2,4 – D y ANA respectivamente, generalmente se usa una Auxina cada vez, sin embargo, en investigaciones realizadas en *euphorbia marginata*, obtuvieron buenos resultados con el uso simultaneo de 2,4 –D y ANA, (Roca y Mroginski (1991).

A.2. Citoquininas

Mejía (1991), Roca y Mroginski (1991), mencionan que la Citoquinina inhibe la dominancia apical y estimula el desarrollo de los tallos laterales. Osorio (1984), citado por salinas (1988), menciona que las citoquininas tienen efecto sobre la síntesis de ADN, además está comprobado que induce actividad de las amilasas y proteasas y la síntesis de la tiamina y auxina.

Las citoquininas producen una mayor actividad en el ritmo de la mitosis celular, lo que implica que promueven la

división celular y retarda el envejecimiento o senescencia de los órganos, ya sea por una acción sobre el ADN o porque la presencia de Citoquinina hace fluir, por un mecanismo desconocido, auxina y nutrientes. Las más utilizadas son: benzilaminopurina (BAP), isopentil- adenina (2 IP) y furfurylamino purina (kinetina) Roca y Mroginski (1991).

En concentraciones altas ($1-10\text{mg}^{-1}$) pueden inducir la formación de vástagos axilares, porque disminuyen la dominancia apical; también retardar el envejecimiento Pierik (1990).

A.3. Acción Combinada de las Auxinas con Citoquininas

Según hurtado y merino (1994), las auxinas son importantes para estimular la iniciación de la raíz, y las citoquininas promueven la formación de brotes. Frecuentemente sus efectos son antagónicos; una de las dos sustancias inhibe la acción de la otra. La eficiencia de ambos depende del tipo de auxinas citoquininas, también mencionan que la auxina más efectiva es el 2,4 S y la menos activa, el AIA. Entre las citoquininas, las más efectivas son la zeatina y el 2ip. Para satisfacer las necesidades hormonales, algunas veces se emplean en un mismo medio dos auxinas o dos citoquininas.

A.4. Giberelinas

Las Giberelinas han sido definidas biológicamente como compuestos que causan elongación de entrenudos, se sabe que entre el endospermo y el embrión existe muy poca o ninguna actividad enzimática, pero la actividad de varias enzimas, incluyendo la alfa amilasa, aumenta mucho después de la aplicación del ácido giberélico. En la semilla en germinación, el embrión secreta ácido giberélico y así controla la movilización de las reservas en el endospermo para su crecimiento y desarrollo Salinas (1988).

Pierik (1990), indica que el AG3 es muy sensible al calor se pierde el 90% de su actividad biológica después del auto clavado, además de causar la elongación de entrenudos, induce el crecimiento de los meristemos y yemas *in vitro*, también menciona que inhibe la formación de raíces. Juntamente con Steegmans (1975), indican que inhibe la formación de vástagos adventicios, Mejía (1991), menciona que influyen en el alargamiento celular.

El AG3, es usado con frecuencia como un regulador de suplemento de las auxinas y citoquininas en medios de cultivo. Es fácilmente soluble en agua, se usa hasta 1000mg/litro.

Cuadro 02: Diversos efectos de las hormonas y reguladores de crecimiento

EFFECTO	AUXINAS	GIBERELINA	CITOQUININA	ÁCIDO ABSÍCICO	ETILENO
Elongación Celular	SI	SI	NO	SI	SI
División celular	SI	SI	SI	NO	SI
Inducción de tejido vascular primario	SI	NO	SI	NO	NO
Inducción de tejido vascular secundario	SI	SI	SI	NO	NO
Inicio de raíces y brotes	SI	SI	SI	SI	SI
Rotura de dormancia	SI	SI	SI	SI	SI
senescencia	SI	SI	SI	SI	SI
Abscisión de flores frutos y hojas	SI	SI	SI	SI	SI
Crecimiento de frutos	SI	SI	NO	NO	SI
Expresión de sexo	SI	SI	NO	NO	SI
Control de apertura de estomas	NO	NO	SI	SI	NO

Fuente (Morales, 1970)

2.2.9.7. Vitaminas

Roca y Mroginski (1991), mencionan que es necesario agregar vitaminas al medio, hasta que los cultivos hayan crecido o se hayan vuelto verdes, en la mayoría de los medios, La Tiamina, Pirodoxina y el Ácido Nicotínico se consideran benéficas y se añaden de forma rutinaria. Otras vitaminas como el Ácido Pantoténico, Biotina, Riboflavina y Colina pueden ser útiles, pero no absolutamente

necesarias, existen vitaminas que son termolábiles como la Glutamina, Asparagina, la Hipoxantina y el Ácido Ascórbico, estas deben esterilizarse por filtración.

Según Moran (1983), citado por Salinas (1980), el uso de vitaminas favorece el desarrollo de los cultivos de tejidos, además de actuar como reguladores del proceso metabólico.

2.2.9.8. Compuestos Nitrogenados

Se reconoce que las formas de nitrógeno reducido tienen cierto valor en el cultivo de tejidos, se ha comprobado que el NH_4 permite mayor crecimiento, pero la adición de asparagina, glutamina u otros aminoácidos no permite aumento de crecimiento, Montoya (1991).

2.2.9.9. Sustancias Orgánicas

Los hidratos de carbono, son indispensables en cultivo de tejidos, debido a la incapacidad del explante en un primer momento, o porque no realizan una fotosíntesis lo suficientemente intensa para poder ser completamente autótrofa; por consiguiente, el carbono debe ser provisto por un hidrato de carbono que generalmente se suministra a través de un azúcar, sacarosa, glucosas y otros Osorio (1984), citado por Salinas (1988).

2.2.9.10. Endospermo de Coco

La leche de coco (endospermo líquido de semilla de coco) es una sustancia que contiene una elaborada mezcla de nutrientes orgánicos y una combinación de hormonas como Auxinas, Giberelinas y Citoquininas Salinas (1988).

Montoya (1991), además menciona que contiene Myo-inositol, algunos agentes de división celular como la difeniluria, β -D, ribofuranosinol – zeatina y contiene una serie de aminoácidos libres como fenilalanina. La calidad de leche de cocos jóvenes es mayor que la de los viejos, que en algunos casos puede inhibir el crecimiento.

2.2.9.11. Carbón Activado

Pierik (1990), indica que el carbón activado se usa en una concentración de 1,2 - 3,0 % p/v. su uso se justifica por lo siguiente:

- Adsorción de pigmentos tóxicos, marrones y negros (compuestos de tipo fenólico y melanina), y de otros compuestos tóxicos incoloros.
- Oscurece el medio, y como resultado de ellos induce la formación de raíces y el crecimiento puede ser modificado
- Estabiliza PH
- Es posible que elimine sustancias que pueden promover el crecimiento
- Adsorción de otros compuestos orgánicos (auxinas, citoquininas, etileno, vitaminas, etc.)

2.2.9.12. Cantidad de medios de cultivo

Para tener una supervivencia y crecimiento de los cultivos se requiere un balance entre la masa del inóculo y la cantidad de nutrientes, Los inóculos muy pequeños se ven grandemente afectadas por cantidades grandes de medios; de la misma manera,

el crecimiento de inóculos grandes frecuentemente está restringido por un inadecuado suministro de medio.

2.2.9.13. Esterilización

El tiempo empleado para una buena esterilización es de 15 minutos a una presión de 15 lb/in² (kg/cm²) y a una temperatura de 120 – 121 °C, debe evitarse la sobre esterilización, ya que podría traer como consecuencia la degradación de ciertos componentes del medio nutritivo, así como la caramelizarían de los azúcares, aminoácidos y reduce la calidad gelificante del agar.

2.3. Definición de Términos

- **Agente Gelificante:** sustancia espesante que contiene sustancias que al agregarse a una mezcla aumentan su viscosidad
- **Asepsia.** Ausencia de gérmenes que puede provocar una infección.
- **Catafilos:** En Botánica se denomina catáfilo o catáfila a cada una de las hojas modificadas y reducidas que generalmente protegen a las yemas de la planta que se hallan en reposo, particularmente en órganos subterráneos de reserva como bulbos y rizomas.
- **Clon elite:** Los clones de élite son plantas exclusivas que sólo existen como plantas madre y esquejes, y no se producen semillas porque el cruce de la hembra con algún macho cambiaría sus rasgos.
- **Explante:** tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento. El nombre explante es una versión castellanizada del vocablo inglés “explant”; acuñado especialmente para identificar los tejidos vegetales cultivados *In Vitro*.

- ***In vitro***: (latín: dentro del vidrio) se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo
- **Medio líquido**: medio de cultivo con sustancias nutritivas sin agente gelificante.
- **Medio sólido**: medio de cultivo con sustancias nutritivas con agente gelificante.
- **Morfogénico**: retroalimentarse por una aportación de energía exterior.
- **Propagación *in vitro***: es aquel realizado sobre un medio nutritivo en condiciones estériles. Puede ser de: plantas, semillas, embriones, órganos, explantes, células y protoplastos. Hace factible la manipulación de las célula individuales o tejidos. Fundamental para transformación genética

2.4. Formulación de la Hipótesis

2.4.1. Hipótesis general

Ninguno de los tratamientos planteados nos dará el mejor resultado

2.4.2. Hipótesis específicas

Por lo menos unos de los tratamientos planteaos nos dará mejor resultado

2.5. Identificación de Variables

Dentro de los factores o las variables en estudio tenemos a las siguientes:

Variable dependiente

Multiplicación *in vitro* de tres variedades de ajos para la formación de microbulbillos

Variable independiente

Estandarización de un protocolo *in vitro* del mejor medio de cultivo para la formación de microbulbillos de tres variedades de ajos

2.6. Definición Operacional de Variables e Indicadores

VARIABLE		DIMENSION	INDICADOR
Independiente	Estandarización de un protocolo <i>in vitro</i> mejor medio de cultivo para la formación de microbulbillo de tres variedades de ajo	M1 Gamborg Miller y Ojima (1965)	
		4 medios de cultivo	
		Inicio	%
		Proliferación	%
		Pre bulbeo	%
		bulbeo	%
		M2 Murashige y Skog (1962) Modificado IBT (2015)	
		Inicio	%
Proliferación	%		
Pre bulbeo	%		
Bulbeo	%		
Dependiente	Multiplicación <i>in vitro</i> de tres variedades de ajos para la formación de microbulbillos	• Porcentaje en la eficiencia en la desinfección	%
		• Altura de planta	Cm
		• Numero de hojas	Unid
		• Número de microbulbillos	Unid
		• Numero de hojas	Unid
		• Longitud de Vitroplanta	Cm
		• Diámetro de Microbulbillo	Cm
		• Peso de Microbulbillos	G
		• Numero de raíces.	cm

CAPITULO III

METODOLOGIA Y TECNICAS DE INVESTIGACION

3.1. Tipo de Investigación

La investigación es experimental y aplicada

3.2. Método de Investigación

El método de investigación utilizando en el trabajo de investigación es el método Inductivo-Deductivo

3.3. Diseño de Investigación

3.3.1. Diseño experimental

Este trabajo fue conducido con un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo factorial de 2x3 (correspondiendo al primer factor 2 medios de cultivo y el segundo a tres variedades de ajos; se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento haciendo un total de 60 unidades experimentales), a un nivel de significancia = 0,05. La comparación de los tratamientos de media se realizó mediante prueba de Tukey al 95% de confianza.

3.3.2. Modelo Estadístico:

El modelo estadístico lineal para un bifactorial en el cual se ajusta el análisis de varianza que es el siguiente.

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + (A * B)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable respuesta

u = efecto común a todas las observaciones

A_i = Efecto de i -ésimo- nivel del factor A; $i = a_1, a_2, \dots, a_i$ niveles A

B_j = efecto del j – ésimo nivel del factor B; $j = b_1, b_2, \dots, b_j$ niveles B

$A*B_{ij}$ =efecto del i -ésimo nivel del factor A con j -ésimo nivel del factor

B ; $ij = a_1b_1, a_1b_2, \dots, a_ib_j$ interacciones

E_{ijk} = Error del modelo

3.3.3. Análisis de Varianza (ANVA)

En el siguiente cuadro se detalla el análisis de varianza:

F.V	GL	SC	CM	FC	FT
Factor A	a-1	SCA	SCA/a-1	CMA/CM Error	F(α ,glA,gl Error)
Factor B	b-1	SCB	SCB/b-1	CMB/AM Error	F(α ,glB,gl Error)
A*B	(a-1)(b-1)	SCAB	SCAB/(a-1)(b-1)	CMAB/CM Error	F(α ,glAB,gl Error)
Error	Ab(r-1)	SCERROR	SCERROR/ab(r-1)		
Total	Ab r-1	SCTOTALES			

3.4. Población y Muestra

Población

Estuvo constituida por el número de plantas de las tres variedades de ajos con dos tratamientos de Medios de cultivo haciendo un total de 60 plántulas.

Muestra

La muestra estuvo representada por de 10 plantas por variedad (3 variedades de ajos), con 2 Medios de cultivo.

3.4.1. Distribución de los tratamientos

Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera:

Tratamientos	Clave	Descripcion
1	M1 B	Medio 1 x var Barranquino
2	M1 N	Medio 1 x var. Napuri
3	M1 BL	Medio 1 x var. Blanco. H
4	M2 B	Medio 2 x var Barranquino
5	M2 N	Medio 2 x var. Napuri
6	M2 BL	Medio 2 x var. Blanco H

Fuente: Elaboración Propia

Donde:

Variedades:

B: Barranquino

N: Napuri

Bl: Blanco Huaralino

Dos medios de cultivo

M1: Ms Gamborg Miller y Ojíma (1965)

M2: Murashige y Skog (1962) Modificado IBT (2015).

Ubicación de cada Tratamientos

1	BM1	NM1	BLM1
2	BM1	BLM1	NM1
3	NM1	BM1	BLM1
4	NM1	BLM1	BM1
5	BLM1	NM1	BM1
6	BLM1	BM1	NM1
7	BM1	NM1	BLM1
8	BM1	BLM1	NM1
9	NM1	BM1	BLM1
10	NM1	BLM1	BM1

11	BLM2	NM2	BM2
12	BLM2	BM2	NM2
13	BM2	NM2	BLM2
14	BM2	BLM2	NM2
15	NM2	BLM2	BM2
16	BM2	NM2	BLM2
17	NM2	BM2	BLM2
18	BLM2	NM2	BM2
19	BLM2	BM2	NM2
20	NM2	BLM2	BM2

10 repeticiones por tratamiento = 60 unidades experimentales

Leyenda:

B: Barranquino

N: Napuri

Bl: Blanco

3.5. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

La técnica de recolección de datos en el trabajo de investigación fue la observación y el principal instrumento de recolección de datos que se utilizó fue la ficha de colección de datos

3.6. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

El procesamiento y el análisis de los datos se realizaron mediante el análisis de varianza de los datos, utilizando el software estadístico Infostat

3.7. Tratamiento Estadístico

Para comparar los promedios de los tratamientos y para poder clasificarlos, se aplicó la prueba de Tukey al 95% de confianza

3.8. Selección, Validación y Confiabilidad de los Instrumentos de Investigación

La selección, validación y confiabilidad de los instrumentos utilizados en la presente investigación se realizaron con el apoyo de bibliografía presentada en trabajos de investigación similares a nuestro tema para determinar el mejor medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* y formación de microbulbillos de tres variedades de ajos. En base a lo obtenido de dichas fuentes, se elaboraron las listas de descriptores morfológicos para nuestra investigación,

3.9. Orientación Ética

El desarrollo del presente trabajo de investigación servirá de referencia para otras investigaciones y contribuirá al conocimiento en el cultivo *in vitro* para la formación de micro bulbillos, fue desarrollado siguiendo los valores éticos del investigador y es así que doy fe que lo que se expone en el presente documento está representado en sus resultados fiel a las evaluaciones realizadas en el laboratorio

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Descripción del Trabajo de Campo

El presente trabajo de investigación tuvo la siguiente secuencia

a) Ubicación del campo experimental

El experimento se realizó en la Universidad Nacional Agraria La Molina, en el área de Cultivo de Tejidos del laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT), departamento de Lima, a una altitud de 247 msnm, longitud 76°57'W y latitud 12°05'S, la duración del experimento fue de 5 meses durante el 2018

b) Ubicación política

Departamento: lima

Provincia: lima

Distrito: la molina

Lugar: universidad nacional agraria la molina (instituto de biotecnología IBT)

4.1.1. Materiales y equipos

A. Material vegetal

Se utilizaron bulbos de ajos cosechados en estado de madurez 3 variedades: Barranquino, Napuri y Blanco Huaralino, se procedio a seleccionar aquellos que no presentaron síntomas y signos de enfermedades, estos bulbos fueron disgregados en sus respectiva “dientes” y se mantuvieron bajo refrigeración (8 a 10 °C) durante 15 dias para estimular el proceso de grelación

B. Materiales de vidrio

- ✓ Tubos de ensayo, frascos de vidrio, jeringas, pipetas y probetas.

C. Equipos

- ✓ Agitador magnético, Autoclave, Balanza analítica, potenciómetro, destilador, estufa, microondas, shakers, incubadora y cámara de flujo laminar.

D. Instrumentos

- ✓ Bisturí, vernier, pinzas (curva, recta), papeles, para film

E. Reactivos

- ✓ Sales de Murashige y Skoog, Vitaminas (Tiamina, Glicina, Acido Nicotínico, Adenina Hormonas (BAP, ANA, kinetina, IAA)

F. Otros Materiales

- ✓ Agua destilada, sacarosa, Myo inositol, sacarosa, alcohol 96°

G. Medios de cultivo

Se utilizaron 2 medios de cultivo el primer medio e de Ms Gamborg Miller y Ojima (1965) adicionado con reguladores de crecimiento kinetina, IAA y el segundo es el de Murashige y Skoog (1962) modificado IBT (2015)

4.1.2. Tratamientos

A. Tratamientos de desinfección

El número de repeticiones por tratamiento fue de 15, cada explante fue sembrado en un tubo de ensayo con medio Ms de Gamborg Miller y Ojíma (1968) y Murashige y Skoog (1962).modificado IBT 2015

Cuadro 03: Tratamientos de desinfección

Pre desinfección			
Tratamiento	Detergente	Bactericida (Phyton)1ml/l	fungicida
T1	10 min	por 1 hora	24 horas
T2	10 min	por ½ hora	Por ½ hora
T3	10 min	por 20 min	por 20 min
Desinfección dentro de cámara de flujo laminar			
	Alcohol 96°	NaOCl%	Después del corte lejía %
T1	1 seg	2 x(20 min)	10x (5 min)
T2	3 seg	2x (20 min)	10x (20 min)
T3	3 seg	2 x(20 min)	10x (20 min)

B. Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo

- **M1** Gamborg Miller y Ojíma (1968)
- **M2** Murashige y Skoog modificado (1962) modificado IBT (2015)

Cuadro 04: Composición del medio de Gamborg Miller y Ojima (1968) para la fase de Multiplicación de las tres variedades de ajos para la formación de Micro Bulbillos

Gamborg Miller y Ojima (1968)				
Concentración mg/l				
Macronutrientes	Inicio	Proliferación	Pre Bulbeo	Bulbeo
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	1650		
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	370	370	370
KNO ₃	2500	1900	1900	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	440	440	440
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	170	170	170
Micronutrientes				
MnSO ₄ .4H ₂ O	10.0	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ .7h ₂ O	2.0	8.6	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	3.0	6.2	6.2	6.2
KI	0.75	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8
Quelato de Hierro				
FeNaEDTA	3.67	3.67	3.67	3.67
Vitaminas				
Myo – Inositol	100	100	100	100
Glicina	2.0	2	2	2
Acido Nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5
Pirodoxina	0.5	0.5	0.5	0.5

Tiamina	0.1	0.5	0.5	0.5
Aminoacido				
Adenina	80	80	80	80
Hormona				
AIA		0.01	0.3	0.6
KINETINA		0.1	1.0	2.0
Otros compuestos orgánicos:				
sacarosa	20 gr/l	20 gr/l	20 gr/l	20 gr/l
Agar	7gr/l	7gr/l	7gr/l	7gr/l
PH	5.5	5.5	5.5	5.5

Fuente: IBT

Cuadro 05: Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog modificado (1962) IBT (2015), para la fase de multiplicación de las tres variedades de ajos para la formación de micro bulbillos

Murashige y Skoog (1962), modificado IBT (2015)				
Concentración mg/l				
Macronutrientes	Inicio	Proliferación	Pre Bulbeo	Bulbeo
NH ₄ NO ₃	1650	1650	reducido a la cuarta parte 412.5	reducido a la cuarta parte 412.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	370	370
KNO ₃	1900	1900	1900	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	440	440
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
Micronutrientes				
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ .7h ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6

H3BO3	6.2	6.2	6.2	6.2
KI	0.83	0.83	0.83	0.83
Na2MoO4.2H2O	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO4.5H2O	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl2.6H2O	0.025	0.025	0.025	0.025
FeSO4.7H2O	27.8	27.8	27.8	27.8
Quelato de Hierro				
FeNaEDTA	3.67	3.67	3.67	3.67
Vitaminas				
Myo – Inositol	100	100	100	100
Glycina	2.0	2	2	2
Acido Nicotínico	0.5	0.5	0.5	0.5
Pirodoxina	0.5	0.5	0.5	0.5
Tiamina	0.1	0.5	0.5	0.5
Hormona				
BAP	0.2	2.0		
ANA			0.5	2.0
Otros compuestos orgánicos:				
sacarosa	20 gr/l	20 gr/l	90gr/l	140gr/l
Agar	liquido	7gr/l	liquido	liquido
PH	5.8	5.8	5.8	5.8

Fuente: IBT

El medio de IBT para la formación de Microbulbos se propuso en base a estudios previos realizados en especies de ajos, donde también se usaron meristemos de ajos para la micropropagación.

La prueba de los medios de cultivo se realizó después de superar un establecimiento *in vitro* de explantes vigorosos y bien desarrolladas para esta

prueba, es decir, aquellas que tenían más de dos hojas con coloración verde y con 10 cm a más

4.1.3. Descripción de los tratamientos

A. Tratamientos de desinfección de la semilla

Para este experimento se trabajó con semillas de ajos de la variedad arequipeña lo cual consistió de 3 tratamientos de desinfección con una pre desinfección antes de ser llevada a cámara de flujo laminar y una desinfección dentro de cámara de flujo laminar los procedimientos fueron los siguientes

A. 1. Primer Tratamiento de desinfección pre desinfección (T1)

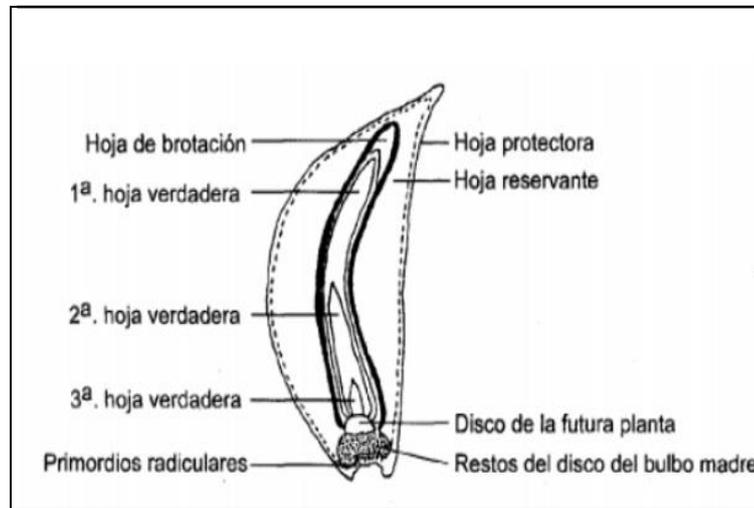
Se pusieron 15 semillas de ajos en frascos estériles de 200 ml, éstas se seccionaron transversalmente a la mitad a fin de exponer el ápice caulinar en crecimiento, fueron remojados en una solución de detergente por 10 min. Con 3 enjuagues con agua corriente, se sumergieron en una solución de bactericida (Phyton 1ml/l) por 1 hora se enjuagó 3 veces con agua corriente y se volvió a sumergir en una solución de fungicida (Benlate 1gr/100ml), por 24 horas y se enjuagó 3 veces con agua destilada.

A.1.1 Desinfección dentro de la Cámara de flujo Laminar

Se eliminaron algunas capas envainadoras y fueron sumergidos en alcohol al 96° por 1 seg, se enjuagó 2 veces con agua destilada estéril, seguido fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos con 3 enjuagues, se eliminaron más capas envainadoras y se volvieron a remojar en lejía al 10 % por 5 minutos con 3 enjuagues, por

último, se eliminaron más hojas envainadoras extrayendo el domo meristemático con dos primordios foliares. El explante obtenido de 3 a 4 mm de longitud fueron puestos en tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo líquido ya preparado.

Figura 01: Esquema corte longitudinal de un diente de ajo.



Fuente: Burba (1992).

A.2. Segundo tratamiento de desinfección (pre desinfección) (T2)

Se pusieron 15 semillas en frascos estériles de 200 ml, estas se seccionaron transversalmente a la mitad a fin de exponer el ápice caulinar en crecimiento, fueron remojados en una solución de detergente por 10 minutos con 3 enjuagues de agua corriente, fueron sumergidos en una solución de bactericida (Phyton 1ml/l) por 1/2 hora, se enjuagó 3 veces con agua corriente y se volvió a remojar en una solución de fungicida (Benlate 1gr/100ml), por 1/2 hora con enjuague de 3 veces con agua destilada.

A.2.1. Desinfección dentro de la cámara de flujo laminar

Se eliminaron algunas capas envainadoras y fueron sumergidos en alcohol al 96° por 3 seg, se enjuago 2 veces

con agua destilada estéril, seguido fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos con 3 enjuagues, se eliminaron más capas envainadoras y se volvieron a sumergir en lejía al 10 % por 20 minutos con 3 enjuagues, por último, se eliminaron hojas envainadoras extrayendo el domo meristemático con dos primordios foliares. El explante obtenida de 3 a 4 mm de longitud fueron puestos en tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo, liquido ya preparado.

A.3. Tercer tratamiento de desinfección (pre desinfección) (T3)

Se pusieron 15 semillas de ajos en frascos estériles de 200 ml, éstas se seccionaron transversalmente a la mitad a fin de exponer el ápice caulinar en crecimiento, fueron sumergidos en una solución de detergente por 10 minutos con 3 enjuagues con agua corriente, seguidos fueron sumergidos en una solución de bactericida (Phyton 1ml/l) por 20 minutos , se enjuagó 3 veces con agua corriente y se volvió a sumergir en una solución de fungicida (Benlate 1gr/100ml), por 20 minutos con enjuague de 3 veces con agua destilada.

A.3.1. Desinfección dentro de la cámara de flujo laminar

Se eliminaron algunas capas envainadoras y fueron sumergidos en alcohol al 96° por 3 seg, se enjuago 2 veces con agua destilada estéril, seguido fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos con 3 enjuagues, se eliminaron más capas envainadoras y se volvieron a

remojar en lejía al 10 % por 10 minutos con 3 enjuagues, por último, se eliminaron hojas envainadoras extrayendo el domo meristemático con dos primordios foliares. El explante obtenida de 3 a 4 mm de longitud fueron puestos en tubos de ensayo conteniendo medios de cultivo ya preparado.

B. Tratamientos de los medios de cultivo

Para el desarrollo de estas prueba se realizó nuevamente la introducción de las tres variedades de ajos utilizando el tratamiento 3 de desinfección, el cual resulto ser el mejor para este proceso.

Por cada variedad se trabajaron 15 repeticiones y cada meristemo se consideró como una repetición, las repeticiones estuvieron en función al material vegetal disponible después de lo obtenido en la desinfección. Como resultado que se obtuvieron fueron aceptables ya no fue necesario utilizar una mayor cantidad de explantes.

B.1. Etapa de Inicio

Se seleccionaron semillas que mostraban indicios de ápice caulinar, en semillas sanas y sin pudrición. Fueron cortados a la mitad y se cortaron capas envainadoras hasta obtener 4,0 mm de longitud de domo meristemático. Esta etapa es importante ya que se evaluará % de desinfección, Altura de planta, Numero de hojas. Las plántulas estuvieron por 30 días en esta etapa, (Foto 02, 03,04)

B.2. Etapa de Proliferación

Se seleccionaron 10 explantes que alcanzaron un desarrollo adecuado (6 a 12 cm de longitud) con 2 hojas, en esta etapa las plántulas aún

son muy débiles y es necesario hacer cortes cada dos semanas, por 60 días, con este método las plántulas engrosaran y así poder soportar los siguientes procesos de pre bulbeo y bulbeo, en la cámara de flujo laminar los brotes fueron seccionados a 4 cm de longitud desde la corona de la planta y se eliminaron sus raíces. Estos explantes se cultivaron en tubos de ensayo conteniendo medios de proliferación, (Foto 08)

B.3. Etapa de Pre Bulbeo

Las plántulas fueron trasladadas al medio de pre bulbeo para inducir a la formación de microbulbillos, esta etapa se hizo cortando la planta a 4 cm de longitud, este medio de pre bulbeo se muestra en el inductor de bulbificación, previamente esterilizado en las mismas condiciones descritas para la micro propagación.

Los cultivos se colocaron en un Shakers en modo de agitación para la absorción de nutrientes con fotoperiodo de 16 h diarias de luz y 8 de oscuridad con temperatura de 18 °C, durante 10 días, (Foto 09,10)

B.4. Etapa de bulbeo

Las vitroplantas obtenidas en la fase anterior fueron empleadas para inducir bulbificación *in vitro*. Al respecto, las plántulas deberán alcanzar un desarrollo adecuado (6 a 8 cm de longitud), y bajo la cámara de flujo laminar, los brotes fueron seccionados a 2.5-3.0 cm de longitud. Estos explantes se cultivaron en frascos conteniendo 20 ml del medio líquido inductor de bulbificación, previamente esterilizado en las mismas condiciones descritas para la micro

propagación, fueron puestas en un shaker, en modo de agitación, para la absorción de nutrientes y llenado de bulbo.

Fueron trasladadas a un cuarto de incubación a fotoperiodo de 16 horas diarias de luz y temperatura de 18°C, durante 60 días, (Foto 11,12)

4.1.4. Evaluación de las variables

Los datos que se registraron en el trabajo de investigación son las referidas a las variables involucradas en este trabajo experimental, los cuales son los siguientes:

A. desinfección

- contaminación de explantes de ajos de las tres variedades Barranquino, Napuri, blanco Huaralino
- sobrevivencia de explantes de las tres variedades de ajos

B. fase de establecimiento

Para la fase de establecimiento de ajos se hicieron evaluaciones semanales por un periodo de cuatro semanas en donde se evaluó lo siguiente:

- altura de planta
- numero de hojas

C. fase de multiplicación

Para la fase de multiplicación se hizo una evaluación de las cuatro semanas de iniciada la prueba y se evaluaron las siguientes variables:

- numero de microbulbillos
- numero de hojas
- longitud de vitoplanta
- diámetro de microbulbillo

- peso de microbulbillo
- numero de raíces

4.2. Presentación, Análisis e Interpretación de Resultados

4.2.1. Tratamiento de Desinfección

Se consideró a los explantes de ajos como contaminados cuando estas han sido atacadas por hongos o bacterias, los agentes pueden aparecer en la misma yema, en el tallo o en la superficie del medio, indicando que el tratamiento empleado no fue efectivo para eliminar los contaminantes.

Cuadro 06: Porcentaje de desinfección de explantes de ajos

Tratamiento	Nº Explantes	% contaminación	% de mortandad por quemaduras	% desinfección
T1	15	3	30	67
T2	15	5	20	75
T3	15	2	6	92

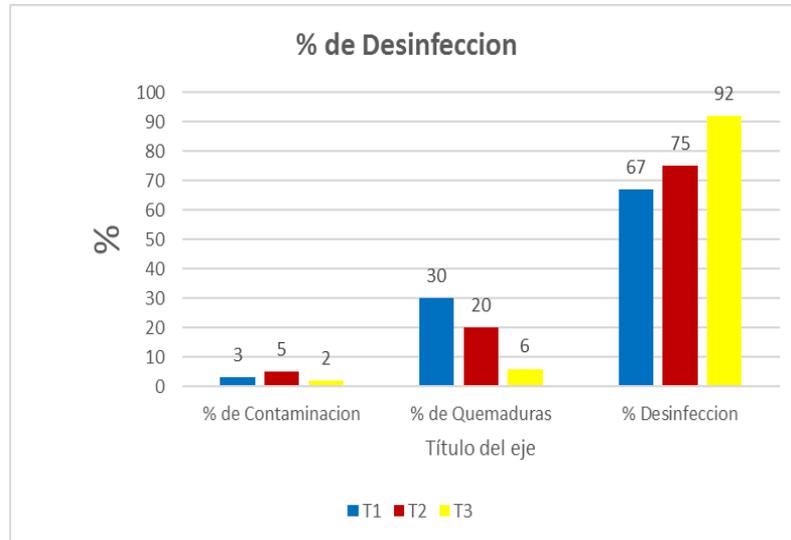
Fuente: Elaboración Propia

De acuerdo con los resultados mostrados en el cuadro 06 y la figura 02, el tratamiento que presenta menor porcentaje de mortandad y contaminación es el tratamiento T3 que consistió de 2 etapas, pre desinfección y desinfección.

Puede observarse también que los tratamientos 1 y 2 tuvieron un menor éxito en la limpieza de las semillas de ajos, (*Allium sativum. L*), el primero presento 3% de contaminación y 30 % de quemaduras y el segundo 5% de contaminación y 20% de, quemaduras la que indica que el tratamiento 3 es el mejor; pero como se expondrá a continuación los resultados de sobrevivencia, nos ayudaran más adelante a elegir cual es el mejor tratamiento en la fase de multiplicación para la formación de microbulbillos de ajos (*Allium sativum. L*).

Los agentes patógenos observados durante las evaluaciones fueron hongos y bacterias. Cabe resaltar que las quemaduras fueron lo que mataron con mayor frecuencia los meristemos de ajos.

Figura 02: Tasa de Desinfección



Fuente: Elaboración Propia

Con estos resultados parciales se observa que a menor concentración y el tiempo de exposición de las semillas de ajos al fungicida y bactericida influyen favorablemente para disminuir la contaminación y mortandad. El uso de hipoclorito de sodio al 2% en el primer corte y 10% de lejía en el corte final para la siembra fué de bastante ayuda para controlar la presencia de hongos y bacterias y sobre todo para controlar la mortandad por quemaduras. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los meristemos empleados fueron de semillas con buen estado y con presencia de ápice caulinar, aun así, hubo contaminación y mortandad por quemaduras.

En un estudio realizado de cultivo *in vitro* de brotes de ajos por Hurtado y Merino (1988), publicaron que el material vegetativo contiene en la superficie abundante microflora que debe ser eliminada por medio de una

desinfección antes del corte y del tejido u órgano que será empleado como inóculo. El agente desinfectante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección, debe ser determinado empíricamente para el material vegetativo con el que se trabaja. En general, casi siempre se usan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio (blanqueador casero), los cuales liberan al cloro como agente desinfectante activo.

Vargas y García (1997), citados por López y colaboradores (2011), mencionan que el NaClO puede ser fitotóxico en altas concentraciones e incluso recomiendan el uso de este desinfectante en cultivos de tejidos vegetales a concentraciones de 0,01 a 3%, lo cual indica una variabilidad de respuesta dependiendo del tejido.

Hasegawa y colaboradores (2000), citados por López y colaboradores (2011), indican que la susceptibilidad de los explantes al hipoclorito de sodio en ajos está asociada al catión Na⁺, el cual corresponde a un ion no esencial en la mayor parte de los tejidos vegetales que es altamente tóxico en una gran variedad de plantas.

4.2.2. Supervivencia de Explantes

No solo se trata de reducir el porcentaje de contaminación también hay que tener en cuenta la supervivencia de los explantes de ajos ya que se puede tener un elevado porcentaje de desinfección como los obtenidos con el T3, pero también puede reportarse muerte de explantes.

En el cuadro 07 y figura 03 se puede observar los resultados obtenidos para la supervivencia de explantes en la segunda introducción de ajos con las tres variedades Burranquino, Napuri, Blanco; al cabo de un mes. Los explantes que han sido considerados como supervivientes a los efectos de los

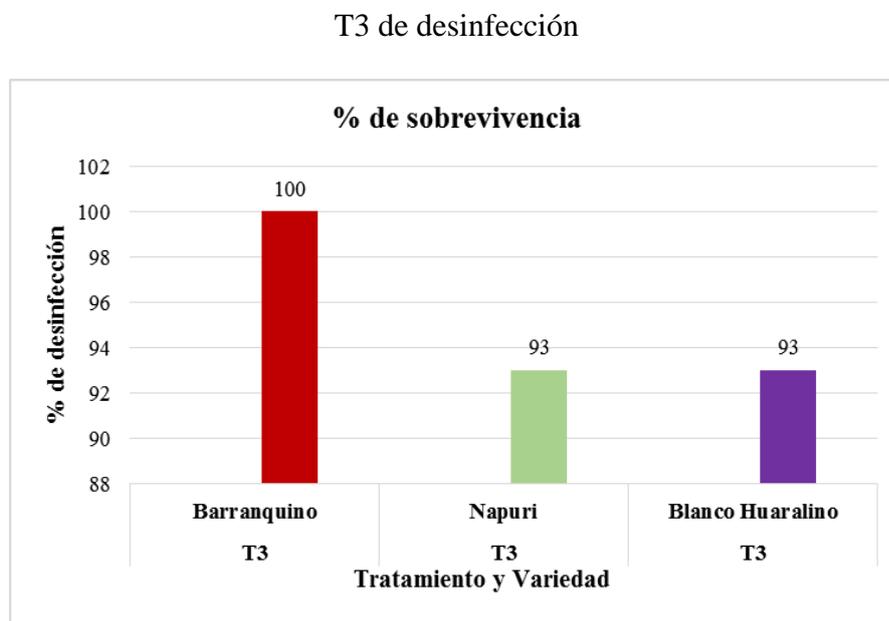
tratamientos, son aquellos que han sido desinfectados y mantuvieron intacta su capacidad de poder crecer y desarrollarse en los medios de cultivo y seguir con las siguientes etapas.

Cuadro 07: Supervivencia de los explantes de las tres variedades de ajos

Tratamiento de Desinfección	Variedad	N° de Explantes	N° de Explantes Vivos (sin contaminados y sin Necrosis)	% Supervivencia
T3	Barranquino	15	15	100
T3	Napuri	15	14	93
T3	Blanco Huaralino	15	14	93

Fuente: elaboración propia

Figura 03: Porcentaje de supervivencia de las tres variedades de ajos con tratamiento



Como se observa al repetir el tratamiento T3 de desinfección con las tres variedades de ajos; Barranquino, Napuri y Blanco. La variedad Barranquino es el que presenta un 100% de efectividad, pero no obstante la variedad Napuri y Blanco presentan un porcentaje de sobrevivencia de 93% que es aceptable.

Las principales causas de muerte de plantas por necrosis observados durante las evaluaciones fueron ocasionadas por el Hipoclorito de Sodio (NaOCL), en la última fase de corte, la composición del hipoclorito afecta al desarrollo del explante causando la necrosis y su muerte. Esto se debe a la capacidad de toxicidad causada por el producto desinfectante a nivel de la célula vegetal (Zevallos, 2009).

Los resultados obtenidos por (Dodds y Roberts, 1986). En un trabajo de investigación de Establecimiento de plántulas *in vitro* de clones de ajo peruano (*Allium sativum L.*) El tratamiento de los explantes con hipoclorito de calcio (1%) e hipoclorito de Sodio (0.1%) durante 10 y 15 minutos, respectivamente, permitió una eliminación total de los microorganismos contaminantes. Los métodos de desinfección pueden excluir todos los microorganismos no infecciosos asociados a la superficie, este aspecto es importante debido a que todos los medios de cultivo empleados son ricos en nutrientes que facilitan el crecimiento de bacterias y hongos.

Otro factor que puede influenciar a la sobrevivencia del meristemo de ajos es el tamaño del meristemo (explante) de ajo sembrado de 0.5-2 mm presenta gran influencia en la limpieza del material vegetal, debido a que entre más pequeño sea el explante menor es el riesgo de contaminación (Pérez, 1998).

4.2.3. Altura de planta a los 30 días para el establecimiento

Cuadro 08: ANOVA para altura de planta de las tres variedades de ajos a los 30 días de establecimiento

Fuente	GL	SC	CM	F	P Significación
Medios	1	29.400	29.40	58.65	< 0.0001
variedad	2	12.730	6.37	12.70	< 0.0001
M*V	2	5.439	2.72	5.42	0.0071
Error	54	27.070	0.50		
Total	59	74.639			

CV = 10.79 %

En el cuadro 08 se muestran los resultados del análisis de varianza para la altura de planta a los 30 días de establecimiento, el cual es altamente significativo estadísticamente (menor a 0.05) para los medios, variedades y la interacción medios x variedad. Esto nos indica que hay diferencia entre los medios y variedades probadas en el proyecto, como la interacción Medio y Variedad es significativo estadísticamente se realiza el análisis de los efectos simples. El coeficiente de variabilidad fue de 10.79 %

En base a la significación estadística alcanzada por los efectos principales y los efectos de interacción, se procedió a realizar el análisis de varianza de los efectos simples de la interacción M x V (cuadro 10)

Cuadro 09: ANOVA de los efectos simples de la interacción M x V para la altura de planta a los 30 días de establecimiento

FUENTE	SC	GL	CM	F	P significación
Medio - Variedad B	15.84	1	15.84	71.86	<0.0001 **
Medio - Variedad N	1.51	1	1.51	2.62	0.1230

Medio - Variedad Bl	17.48	1	17.48	24.77	<0.0001 **
Variedad - M1	11.26	2	5.63	21.88	<0.0001 **
Variedad - M2	6.91	2	3.45	4.64	0.0186 **
Error	27.1	54	0.50		

En el cuadro 09 se muestra el ANVA de los efectos simples de la interacción M x V para altura de planta a los 30 días fase de establecimiento, donde se observa que las fuentes Medios en interacción con variedad B y BL, presentaron significación estadística, por otro lado, las fuentes de V en interacción con M1 y M2 también presentaron significación estadística lo que indica que se deben comparar las medias según Tukey al 5% de probabilidad para todas las interacciones significativas.

Cuadro 10: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para altura de planta de las tres variedades de ajos a los 30 días de establecimiento, según Tukey al 5% de probabilidad

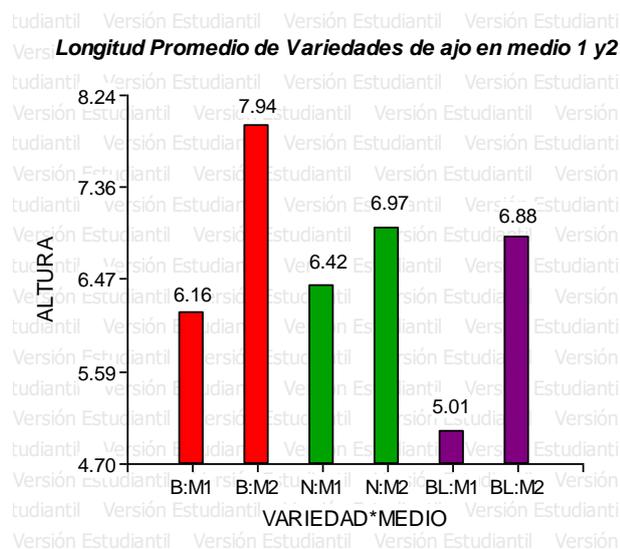
Interacción	líneas	Promedio	Agrupación
B	M2	7.94	A
	M1	6.16	B
N	M2	6.97	A
	M1	6.42	A
BL	M2	6.88	A
	M1	5.01	B
M1	B	6.16	A
	BL	5.01	B
M2	B	7.94	A
	BL	6.88	B

En el cuadro 10, se presenta la prueba de comparación de medias de los efectos simples de la interacción M x V para altura de planta a los 30 de establecimiento, según Tukey al 5% de probabilidad. Se observa que las interacciones B y BL con promedios 7.94 y 6.88 respectivamente con el medio M2 compuesto por Murashige y Skoog fueron significativamente diferente frente al medio M1, por lo tanto el M2 sería el más adecuado para estas variedades.

Para el caso de la variedad Napuri no presenta diferencia entre los medios, responde de igual forma tanto para los medios M1 y M2 ya que obtuvo alturas promedios similares.

Por otro lado, cuando se interacciono M1 y M2 con variedad B con promedios de 6.16 y 7.94 fue significativamente diferente a la variedad BL.

Figura 04: Gráfico de barras de altura promedio de las 3 variedades de ajos a los 30 días en fase de establecimiento



DISCUSION

Estos resultados se atribuyen a que los micro elementos resultan ser indispensables para el crecimiento, intervienen como activadores (eventualmente como constituyentes) de diversos sistemas enzimáticos; a veces los micro elementos se utilizan a concentraciones más elevadas con el objetivo de provocar una activación de crecimiento Margara (1988).

4.2.4. Número de Hojas a los 30 días de establecimiento

Cuadro 11: ANOVA para número de hojas a los 30 días fase de establecimiento.

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor significación
Medios	1	2.82	2.82	12.17	0.001 **
Variedad	2	0.63	0.32	1.37	0.263
M*V	2	0.23	0.12	0.50	0.607
Error	54	12.50	0.23		
Total	59	16.18			

CV = 17.29 % CV (Aj) = 7.40%

En el cuadro 11 del análisis de varianza para número de hojas a los 30 días; se observa que, en la fuente Medios existe una alta significación estadística, debido al comportamiento heterogéneo de los medios para este carácter en estudio. Para las fuentes variedad e interacción M x V no existe diferencia significativa, porque los niveles de cada factor actuaron independientemente. El coeficiente de variabilidad fue de 17.29 % el cual indica que dentro de cada tratamiento el número de hojas fue heterogéneo

Cuadro 12: Prueba de significación de medias de los Medios de cultivo para el número de hojas a los 30 días fase de establecimiento, según Tukey al 5% de probabilidad.

Medios	N	Medias	Agrupación
M1	30	2.57	A
M2	30	3.00	B

En el cuadro 12 de la prueba de significación de los promedios para número de hojas a los 30 días de establecimiento en la fuente de medios, se observa que los medios M1 de Gamborg Miller y Ojima con promedio de 2.57 y M2 de Murashige y Skoog con promedio de 3.0 son diferentes.

Figura 05: Comparaciones de número de hojas en los medios M1 y M2

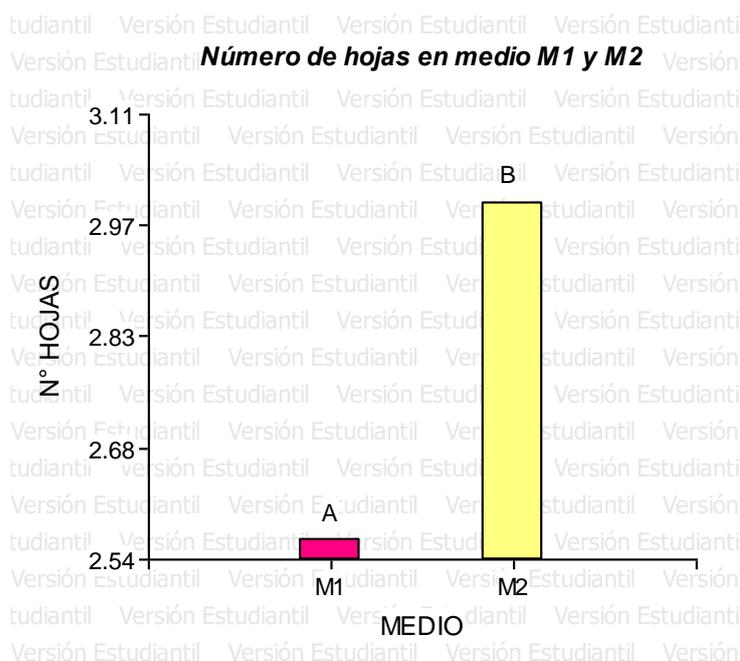
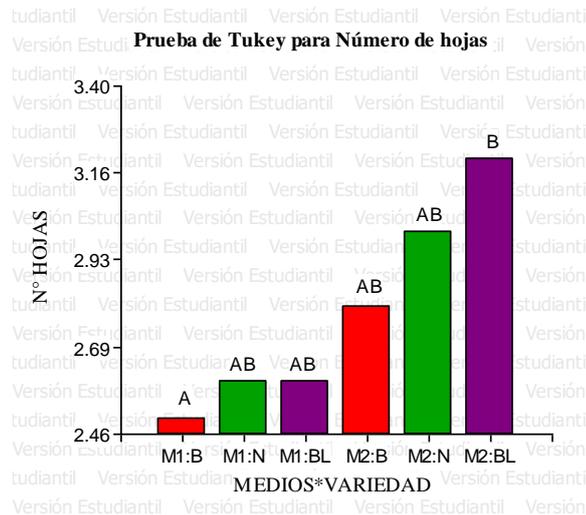


Figura 06: Gráfico de barras de Número de Hojas promedio de las Tres Variedades de Ajos a los 30 días de establecimiento



En la figura 5 y 6 se muestran que los medios M1 y M2 son diferentes estadísticamente, dando con mejores resultados en los medios M2 que es el de Murashige y Skoog IBT, ya que presenta mayor promedio de número de hojas en las tres variedades de ajos, hasta 3 hojas por planta.

DISCUSION

Encontramos que los nutrientes y minerales son los componentes básicos del cultivo de tejidos vegetales. Determinan cuán rápido crecerá el tejido vegetal utilizado y la respuesta morfológica de este, se verán fuertemente influenciadas por la concentración de los nutrientes que se le suministren al medio de cultivo. Además, la selección de un medio de cultivo depende principalmente de la especie a ser trabajada, del tipo de tejido vegetal u órgano vegetal a ser cultivada y del propósito del experimento (Dods y Roberts, 1995).

Luego del establecimiento *in vitro* de las tres variedades de ajos, la siguiente fase en la micropropagación de los explantes, es la fase de formación de microbulbillo. Esta es una de las fases más importantes para la propagación *in vitro* porque se da más importancia a la formación de

microbulbillos; ya que al obtener un mayor número de micro bulbillos se podrán obtener una mayor cantidad de nuevas plantas *in vitro* de ajos.

En esta prueba del trabajo de investigación de medios para la formación de microbulbillos de ajos también se evaluaron, el número de microbulbillos, número de hojas, longitud de vitroplanta, diámetro de microbulbillo, peso de microbulbillo, número de raíces. En esta prueba si se usó fitohormonas, para observar cómo influyen los distintos reguladores de crecimiento en el desarrollo y crecimiento de los explantes de las tres variedades de ajos. Como se mencionó anteriormente el parámetro más importante en esta prueba es el número de microbulbillos que formen por cada variedad, pero no solo es importante el mayor número sino también la morfología de la planta, no sirve tener varios microbulbos si la planta presenta una morfología no muy buena; en la presente investigación se obtuvieron los siguientes resultados.

4.2.5. Número de Microbulbillo por planta

Cuadro 13: ANOVA para número de microbulbillos por planta

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor
Medios	1	64.07	64.07	75.87	< 0.0001
Variedad	2	49.60	24.80	29.37	< 0.0001
M*V	2	27.73	13.87	16.42	< 0.0001
Error	54	45.60	0.84		
Total	59	187.00			

CV = 36.76% CV (Aj) = 12.26%

En el cuadro 13 se muestran los resultados del análisis de varianza para número de microbulbillos por planta, el cual es altamente significativo para

Medios, Variedad y la interacción M x V lo que nos indica que hay una diferencia entre los medios y variedades probadas en el proyecto. El coeficiente de variabilidad es de 36.76 % y haciendo el ajuste resulta 12.26%.

Cuadro 14: ANOVA de los efectos simples para número de microbulbillos por planta de las tres variedades de ajos

FUENTE	SC	GL	CM	F	P significación
Medio - Variedad B	57.80	1	57.80	72.25	<0.0001 **
Medio - Variedad N	33.80	1	33.80	58.50	<0.0001**
Medio - Variedad BL	0.20	1	0.20	0.17	0.6823
Variedad - M1	5.07	2	2.53	2.59	0.0935
Variedad - M2	72.27	2	36.13	50.81	<0.0001**
Error	45.60	54	0.84		

En el cuadro 14 se muestra el ANVA de los efectos simples de la interacción M x V para número de microbulbillos por planta, donde se observa que las fuentes M en interacción con variedad B y N, presentaron significación estadística, por otro lado, las fuentes de V en interacción con M2 también presentó significación estadística lo que indica que se deben comparar las medias según Tukey al 5% de probabilidad para todas las interacciones significativas.

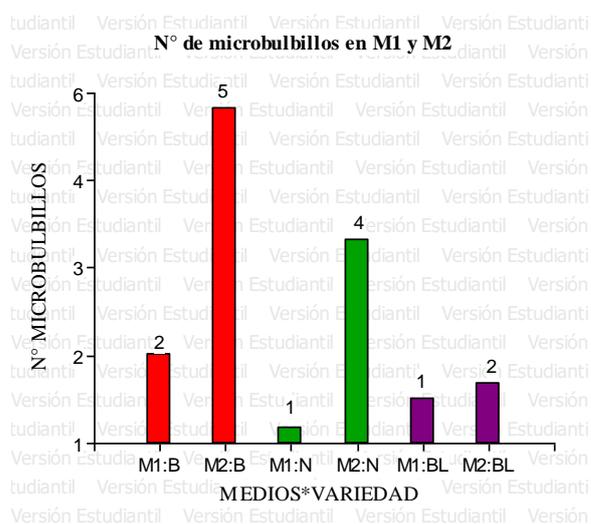
Cuadro 15: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para número de microbulbillos por planta de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad

Interacción	líneas	Promedio	Agrupación
B	M2	5.4	A

N	M2	3.6	A
BL	M2	1.6	A
M1	B	2.0	A
	N	1.0	B
M2	B	5.4	A
	N	3.6	B

En el cuadro 15, se presenta la prueba de comparación de medias de los efectos simples de la interacción M x V para número de microbulbillos por planta según Tukey al 5% de probabilidad. Se observa que las interacciones B, N y BL con promedios 5.4, 3.6 y 1.6 número de microbulbillos por planta respectivamente con el medio M2 compuesto por Murashige y Skoog, fue significativamente diferente frente al medio M1 compuesto por Miller y Ojima por lo tanto el medio M2 sería el más adecuado para estas variedades. Para el caso de la interacción M1 y M2 con variedad B con promedios de 2.0 y 5.4 fue significativamente diferente a la variedad BL.

Figura 07: Grafico de barras de número de microbulbillos por planta de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2



DISCUSION

(Pateña *et al.*, 1998), el éxito de la bulbificación, depende altamente de la concentración de los reguladores de crecimiento y de sacarosa, entre otros (Mohamed – *et al.*, 1995), lo que implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos

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

4.2.6. Número de Hojas

Cuadro 16: ANOVA para número de hojas por planta

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor significación
Medios	1	1.667	1.667	0.65	0.424
Variedad	2	72.300	36.150	14.10	< 0.0001 **
AxB	2	2.233	1.117	0.44	0.6491
Error	54	138.400	2.563		
Total	59	214.600			

CV = 59.29% CV (Aj) = 23.35%

En el cuadro 16 se muestran los resultados del análisis de varianza, el cual es altamente significativo estadísticamente (menor a 0.05) para la variedad, mientras que para medios y la interacción M x V no es significativo. Lo cual nos indica que hay una diferencia entre las variedades probadas en el proyecto. El coeficiente de variabilidad fue de 59.29 % y haciendo el ajuste resultado 23.35

Cuadro 17: Prueba de significación de medias de las variedades para número de hojas, según Tukey al 5% de probabilidad.

OM	Variedades	Medias	Agrupación
1	B	4.3	A
2	N	2.0	B
2	BL	1.8	B

En el cuadro 17, de la prueba de significación de los promedios para el número de hojas se observa que las variedades N y BL con promedios 2.0 y 1.8 no difieren estadísticamente entre ellas, también se puede considerar que la variedad B con promedio 4.3 resulto con mayor número de hojas

Figura 08: Comparaciones de número de hojas por planta

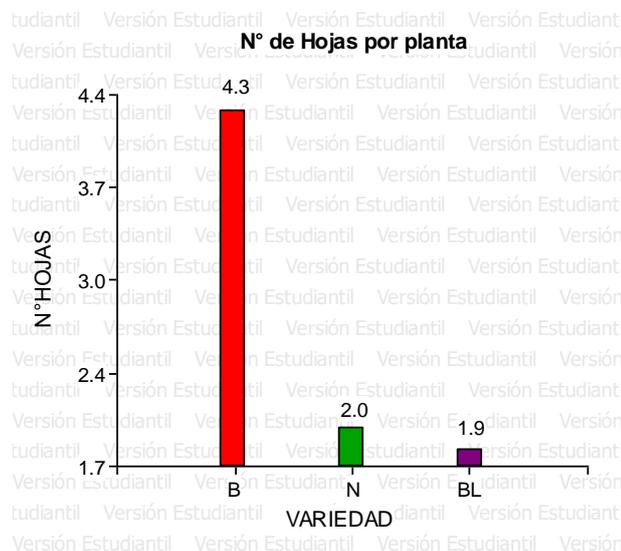
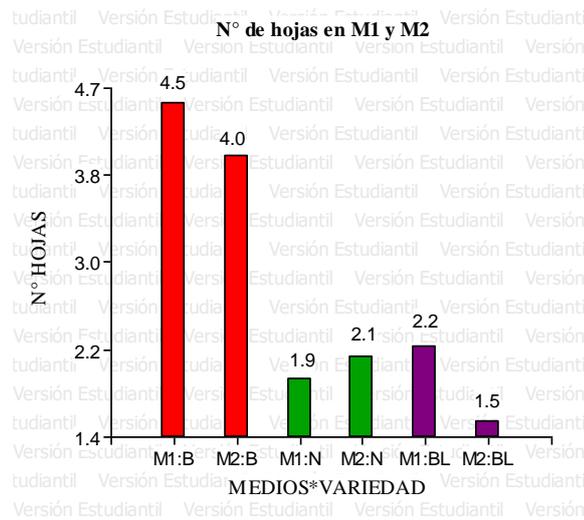


Figura 09: Grafico de barras de número de hojas por planta de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2



DISCUSION

El uso de fito reguladores ha permitido la obtención de un número variable de hojas en plántulas establecidas de ajo. Se ha descrito el desarrollo de plántulas de ajo criollo morado con dos hojas en medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento (Torres, 2013), así como el desarrollo de plántulas de ajo criollo y Rubí-1 con 3.41 y 4.18 hojas, respectivamente usando medio MS con la adición de 0.1 mg. L-1 de AIA o ANA y 0 ó 0.1mg. L-1 de KIN (Parra, 2006)

4.2.7. Longitud de Vitroplantas

Cuadro 18: ANOVA para longitud de vitroplantas

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor
Medios	1	165.37	165.369	20.82	< 0.0001
Variedad	2	115.50	57.751	7.27	0.0016
AxB	2	98.59	49.296	6.21	0.004
Error	54	428.89	7.942		

Total	59	808.35			
--------------	----	--------	--	--	--

CV = 47.87% CV (Aj) = 26.22%

En el cuadro 18 se muestran los resultados del análisis de varianza para longitud de vitropianta, el cual es altamente significativo estadísticamente (menor a 0.05) para los Medios, Variedad y la interacción M x V. Lo cual nos indica que hay una diferencia entre los medios y variedades probadas en el proyecto. El coeficiente de variabilidad fue de 47.87 % y haciendo el ajuste resultó 26.22%

Cuadro 19: ANOVA de los efectos simples para longitud de vitropiantas de las tres variedades de ajos

FUENTE	SC	GL	CM	F	P significación
Medio - Variedad B	136.14	1	136.14	17.56	0.0005 **
Medio - Variedad N	127.36	1	127.36	20.50	0.0003 **
Medio - Variedad BL	0.46	1	0.46	0.05	0.8311
Variedad - M1	0.76	2	0.38	0.06	0.9440
Variedad - M2	2.13.33	2	106.67	11.47	0.0002 **
Error	428.89	54	7.942		

En el cuadro 19 se muestra el ANVA de los efectos simples de la interacción M x V para longitud de vitropianta, donde se observa que las fuentes M en interacción con variedad B y N, presentaron significación estadística, por otro lado, las fuentes de V en interacción con M2 también presentó significación estadística lo que indica que se deben comparar las medias según Tukey al 5% de probabilidad para todas las interacciones significativas.

Cuadro 20: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para longitud de vitroplantas de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad

Interacción	líneas	Promedio	Agrupación
B	M2	9.66	A
N	M2	9.19	A
BL	M2	3.79	A
M1	B	4.45	A
	N	4.14	A
M2	B	9.67	A
	N	9.19	A

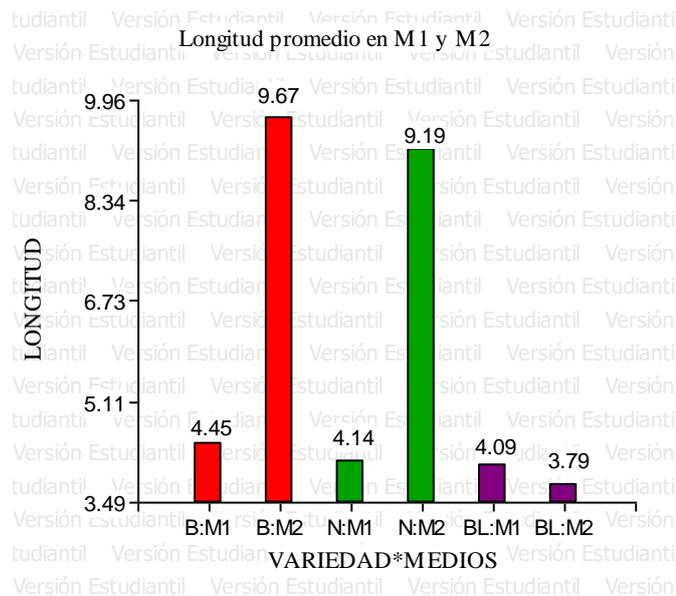
En el cuadro 20, se presenta la prueba de

comparación de medias de los efectos simples de la interacción M x V para número de microbulbillos por planta según Tukey al 5% de probabilidad. Se observa que las interacciones B, N y BL con promedios 9.66, 9.19 y 3.79 de longitud de vitroplanta respectivamente con el medio M2 compuesto por Murashige y Skoog, fue significativamente diferente frente al medio M1 compuesto por Miller y Ojima por lo tanto el medio M2 sería el más adecuado para estas variedades.

Para el caso de la interacción M1 y M2 con las variedades B y N no fueron significativos

Por otro lado las interacciones de M2 con la variedad B con promedio de 9,67 ocupa el primer lugar seguido de N con promedios de 9.19 ocupando el segundo lugar y por ultimo variedad BL con promedio de 3.79

Figura 10: Grafico de barras de longitud de vitroplantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2



DISCUSION

Hurtado y Merino (1992), indican que las citoquininas inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, así mismo Margara (1988), menciona que las altas concentraciones de macronutrientes como fosfato de amonio, nitrato de potasio influyen en el desarrollo lo que indicaría que el agregado de los macroelementos - microelementos mas los reguladores de crecimiento (auxina/citoquinina), no tiene efecto alguno sobre esta variable; ésta es importante en la fase de multiplicación, porque de ella dependerá obtener en el menor tiempo, mayor número de microplantas.

En plántulas de ajo morado Barranquino producidas a partir de meristemas, el uso de medio MS modificado (doble concentración de micronutrientes) con 0.3 mg. L-1 de BAP y 0.15 mg. L-1 de ANA produjo una altura de plántula de 6.66 cm, respuesta dada por la mayor concentración de

micronutrientes y no por la influencia de reguladores de crecimiento (Carhuaricra *et al.*, 2012).

El uso del medio MS con 0.5 mg. L-1 de BAP y 0.1 mg. L-1 de ANA en el establecimiento de diversos cultivares de ajo logró el desarrollo de plántulas con 50 a 60 mm de longitud en un período de ocho a diez semanas de cultivo (Olivera, 2009).

4.2.8. Diámetro de microbulbillos

Cuadro 21: ANOVA para diámetro de microbulbillos

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor
Medios	1	63.04	63.037	20.63	< 0.0001
Variedad	2	88.16	44.082	14.43	< 0.0001
AxB	2	28.32	14.161	4.63	0.014
Error	54	165.02	3.056		
Total	59	344.54			

CV = 48.57% CV (Aj) = 18.70%

En el cuadro 21 se muestran los resultados del análisis de varianza para la longitud de vitroplanta el cual es altamente significativo estadísticamente (menor a 0.05) para los Medios, Variedad y la interacción M x V. Lo cual nos indica que hay una diferencia entre los Medios y Variedades probadas en el proyecto. El coeficiente de variabilidad fue de 48.57 % y haciendo el ajuste nos da como resultado 18.70 %

Cuadro 22: ANOVA de los efectos simples para diámetro de microbulbillos de las tres variedades de ajos

FUENTE	SC	GL	CM	F	P significación
--------	----	----	----	---	-----------------

Medio - Variedad B	11.74	1	11.74	3.60	0.0738
Medio - Variedad N	77.26	1	77.26	31.42	<0.0001 **
Medio - Variedad BL	2.36	1	2.36	0.68	0.4192
Variedad - M1	41.81	2	20.91	6.38	0.0054 **
Variedad - M2	74.86	2	37.33	13.17	0.0001**
Error	344.54	54	3.056		

En el cuadro 22 se muestra el ANVA de los efectos simples de la interacción M x V para diámetro de microbulbillo, donde se observa que las fuentes M en interacción con la variedad N, presentó significación estadística, por otro lado, las fuentes de V en interacción con M1 y M2 también presentaron significación estadística lo que indica que se deben comparar las medias según Tukey al 5% de probabilidad para todas las interacciones significativas.

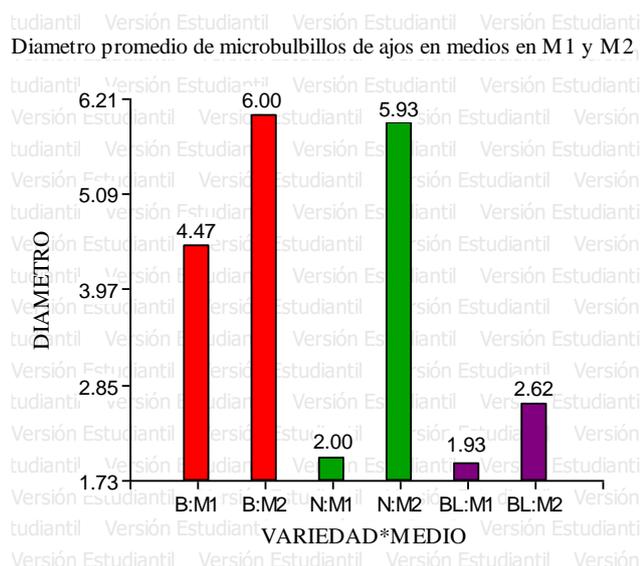
Cuadro 23: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para diámetro de microbulbillos de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad

Interacción	líneas	Promedio	Agrupación
B	M2	6.0	A
	M1	4.5	B
N	M2	5.9	A
	M1	1.9	B
BL	M2	2.6	A
	M1	1.9	B
M1			
	N	2.0	A
M2			
	N	1.9	A

En el cuadro 23, se presenta la prueba de comparación de medias de los efectos simples de la interacción M x V para diámetro de microbulbillos por planta según Tukey al 5% de probabilidad. Se observa que las interacciones B, N y BL con promedios 6.0, 5.9 y 2.6 respectivamente con el medio M2 compuesto por Murashige y Skoog, fue significativamente diferente frente al medio M1 compuesto por Miller y Ojima por lo tanto el medio M2 sería el más adecuado para estas variedades.

Para el caso de la interacción M1 y M2 con las variedades N responde de igual manera ante estos dos medios

Figura 11: Grafico de barras de diámetro de microbulbillos por plantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2



4.2.9. Peso de microbulbillos

Cuadro 24: ANOVA para peso de microbulbillos

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor
Medios	1	48.85	48.852	15.87	0.0002

Variedad	2	13.43	6.715	2.18	0.123
AxB	2	23.43	11.714	3.81	0.028
Error	54	166.21	3.078		
Total	59	251.92			

CV = 54.80 % CV (Aj) = 22.84%

En el cuadro 24 se muestran los resultados del análisis de varianza para peso de microbulbillos por planta, el cual es altamente significativo (menor a 0.05) para Medios e interacción M x V, mientras que para variedad no es significativo, lo cual nos indica que hay una diferencia entre los Medios y la interacción M x V, como la interacción M x V es significativo se realiza el análisis de efectos simples. El coeficiente de variabilidad fue de 54.80 % y haciendo el ajuste resultó 22.84 %

Cuadro 25: ANOVA de los efectos simples para peso de microbulbillos de las tres variedades de ajos

FUENTE	SC	GL	CM	F	P significación
Medio - Variedad B	2.26	1	1.26	0.88	0.3619
Medio - Variedad N	62.87	1	62.87	33.29	<0.0001 **
Medio - Variedad BL	7.15	1	7.15	1.50	0.2363
Variedad - M1	26.59	2	13.30	5.04	0.0138 **
Variedad - M2	10.27	2	5.13	1,46	0.2504
Error	166.21	54	3.078		

En el cuadro 25 se muestra el ANVA de los efectos simples de la interacción M x V para peso de microbulbillo, donde se observa que las fuentes M en interacción con la variedad N, presentó significación estadística, por otro lado, las fuentes de V en interacción con M1 también

presentó significación estadística lo que indica que se deben comparar las medias según Tukey al 5% de probabilidad para todas las interacciones significativas.

Cuadro 26: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para peso de microbulbillos de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad

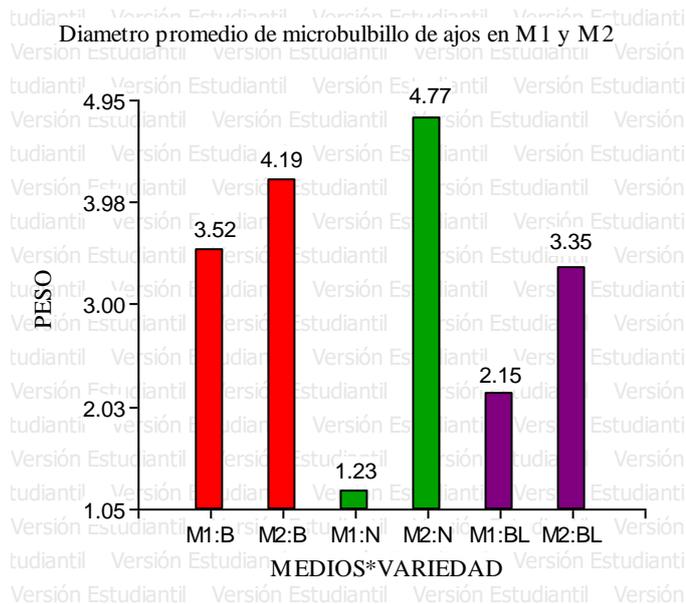
Interacción	líneas	Promedio	Agrupación
B	M1	3.5	A
N	M1	1.2	A
BL	M1	2.2	A
M1			
	N	1.2	A
M2			
	N	4.8	A

En el cuadro 26, se presenta la

prueba de comparación de medias de los efectos simples de la interacción M x V para peso de microbulbillos por planta según Tukey al 5% de probabilidad. Se observa que las interacciones B, N y BL con promedios 3.5, 1.2 y 2.2 respectivamente con el medio M1 compuesto por Miller y Ojima, fueron significativos

Para el caso de la interacción M2 y M1 con las variedades N con promedios de 4.8 y 1.2 fueron significativos

Figura 12: Grafico de barras de peso de microbulbillos por plantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2



DISCUSION

Ravnikar *et al.* (1993) y Moriconi *et al.* (1990), quienes indican que en la etapa de microbulbeo obtuvieron mejores resultados utilizando como regulador 2ip y AIA en 2 ml/l y 2 ml/l.

Olivera (2009), en las variedades de ajo “Arequipeño” y “Napuri” ha determinado que el IBA en concentraciones de 2mL/L a 4 mL/L logró la mejor respuesta de las microplantas.

Por tanto, los resultados de los tratamientos M1 Y M2 se debieron al efecto de las hormonas utilizadas

4.2.10. Número de Raíces

Cuadro 27: ANOVA para número de raíces por vitroplantas

Fuente	GL	SC	CM	F	P-valor
Medio	1	2666.7	2666.7	156.56	< 0.0001
Variedad	2	3572.6	1786.32	104.87	< 0.0001
M*V	2	2612.6	1306.32	76.69	< 0.0001
Error	54	919.8	17.03		

Total	59	9771.7			
--------------	----	--------	--	--	--

CV = 44.54% CV (Aj) = 13.19%

En el cuadro 27 se muestran los resultados del análisis de varianza para el número de raíces por vitroplanta, el cual es altamente significativo (menor a 0.05) para los Medios, Variedades y la interacción M x V. lo cual nos indica que hay una diferencia entre los Medios y Variedades probadas en el proyecto. El coeficiente de variabilidad fue de 44.54 % y haciendo el ajuste resultado 13.19 %.

Cuadro 28: ANOVA de los efectos simples para número de raíces por vitroplantas de las tres variedades de ajos

FUENTE	SC	GL	CM	F	P significación
Medio - Variedad B	5088.05	1	5088.05	149.72	<0.0001 **
Medio - Variedad N	162.45	1	162,45	15,71	0.0009 **
Medio - Variedad BL	28.80	1	28.80	4.25	0.0540
Variedad - M1	86.40	2	43.20	9.82	0.0006 **
Variedad - M2	6098.87	2	3049.43	102.8	<0.0001 **
Error	919.8	54	17.03		

En el cuadro 28 se muestra el ANVA de los efectos simples de la interacción M x V para número de raíces por vitroplanta, donde se observa que las fuentes M en interacción con la variedad B y N, presentó significación estadística, por otro lado, las fuentes de V en interacción con M1 y M2 también presentaron significación estadística lo que indica que se deben comparar las medias según Tukey al 5% de probabilidad para todas las interacciones significativas.

Cuadro 29: Prueba de significación de los efectos simples de la interacción M x V para número de raíces por vitroplanta de las tres variedades de ajos según Tukey al 5% de probabilidad

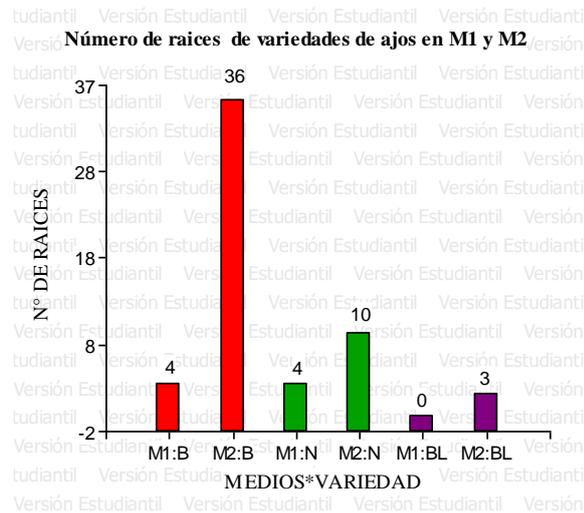
Interacción	líneas	Promedio	Agrupación
B	M2	4.2	A
	M1	3.5	B
N	M2	4.8	A
	M1	1.2	B
BL	M2	3.3	A
	M1	2.1	B
M1	B	3.5	A
	N	1.2	B
M2	B	4.2	A
	N	4.8	B

En el cuadro 29, se presenta la prueba de

comparación de medias de los efectos simples de la interacción M x V para número de raíces por vitro planta, según Tukey al 5% de probabilidad. Se observa que las interacciones B, N y BL con promedios 4.2, 4.8 y 3.3 respectivamente con el medio M2 compuesto por Murashige y Skoog fueron significativamente diferente frente al medio M1 compuesto por Gamborg y Skoog, por lo tanto el M2 sería el más adecuado para estas variedades.

Por otro lado, cuando se interaccionó M1 y M2 con variedad B con promedios de 3.5 y 4.2 fue significativamente diferente a la variedad N.

Figura 13: Grafico de barras de numero de raíces por vitroplantas de las 3 variedades de ajos en los medios M1 y M2



DISCUSION

Bustamante y Muñoz (1993), en cultivo *in vitro* de ajo, mencionan que El porcentaje de explantes con raíces y el número de raíces por explante fueron superiores en medio MS con kinetina y AIA, en etapa final de medios de cultivo para la estimulación de brotes.

El tratamiento M1 que ha mostrado menores valores en número de raíces, a diferencia del tratamiento M2, se debería a la alta concentración de la auxina, lo que inhibe la regeneración y elongación de la raíz. Al respecto Ayerbe y Sagasta (1990), señalan que, en concentraciones elevadas de auxinas entre 0.6 y 1 ml/l, generalmente inhiben la formación de raíces. El medio que ha resultado más prometedor para la fase de introducción en el cultivo de ajo ha sido el tratamiento

La longitud de raíces, del tratamiento M2 han sido superior al Tratamiento M1, esto coincide con los resultados de Bustamante y Muñoz (1993) usando MS conteniendo BAP en 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L + 0,1.1.0 y 2 mg/L de ANA en el cultivo *in vitro* de ajo, encontraron que el porcentaje de explantes con raíces y el número de raíces por explante fueron superiores con BAP, que con KIN

4.3. Prueba de Hipótesis

Durante la conducción del presente trabajo de investigación se plantearon dos hipótesis para cada una de las evaluaciones realizadas; la hipótesis nula y la hipótesis alterna. La primera consistía en: ninguno de los tratamientos planteados nos dará el mejor resultado; mientras que la hipótesis alterna H_a : por lo menos unos de los tratamientos planteados nos dará mejor resultado. Para poder decidir si se rechaza o no se acepta la hipótesis nula, se obtuvo un valor (F calculada), si en la interacción Medios de cultivo con variedad resulta significativo, las conclusiones más importantes son las que se deducen de los efectos simples de Medios, con significación estadística que son del (1 al 5%), si la interacción de Medios por variedad resulta no significativo las conclusiones más importantes se deducen de los efectos principales de Medios y de los efectos principales de variedades con significación así como lo que se deduzcan de los efectos simples de Medios y de los efectos simples de Variedades que resultan significativos mediante la prueba de Tukey destacando que para las tres variedades de ajos el mejor medios de cultivo fue M2 en los parámetros mencionados como número de micro bulbillos, número de hojas, diámetro de micro bulbillos, peso de microbulbillos,

4.4. Discusión de Resultados

En la presente investigación se determinó la Multiplicación de Plantas Mediante el Sistema de Cultivo *In Vitro* de tres variedades de ajos para la formación de Microbulbillo utilizando dos medios de cultivo que fueron M1 (Miller y Ojima) y M2 (Murashige y Skoog modificado IBT 2015), cada uno constituido con 4 medios de cultivo (inicio, proliferación, pre bulbeo y bulbeo). Mediante el análisis de varianza se determinó que para la variable porcentaje de desinfección el

tratamiento T3 que consta con una pre desinfección de detergente por 10min, phyton por 20 min. y fungicida por 20 min adicionada con una desinfección en cámara de flujo laminar de hipoclorito de sodio al 2% en el primer corte y 10% de lejía en el corte final fue el correcto para controlar la presencia de hongos y bacterias y controlar la mortandad de quemaduras con un 92% de sobrevivencia, a diferencia del tratamiento T1 que resulto con un 67% y T2 con un 75% de sobrevivencia.

En un estudio realizado de cultivo *in vitro* de brotes de ajos por Hurtado y Merino (1988), publicaron que el material vegetativo contiene en la superficie abundante microflora que debe ser eliminada por medio de una desinfección antes del corte y del tejido u órgano que será empleado como inoculo. El agente desinfectante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección, debe ser determinado empíricamente para el material vegetativo con el que se trabaja. En general, casi siempre se usan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio (blanqueador casero), los cuales liberan al cloro como agente desinfectante activo.

En la variable número de microbulbillos por planta, se reporta que en la interacción M2 compuesto (Murashige y Skoog modificado IBT 2015), con las tres variedades de ajos Barranquino, Napuri, Blanco Huaralino, se obtuvo promedios de 5.4, 3.6 y 1.6 microbulbillos siendo el más adecuado para la formación de microbulbillo, cabe resaltar que (Pateña *et al.*, 1998), menciona que el éxito de la bulbificación, depende altamente de la concentración de los reguladores de crecimiento y de sacarosa, entre otros (Mohamed – *et al.*, 1995), lo que implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos

En la variable número de hojas por planta los promedios de los 2 medios de cultivos M1 (Miller y Ojima) y M2 (Murashige y Skoog modificado IBT 2015), dieron como resultados valores similares en las tres variedades M1xB 4.5 hojas, M2xB 4.0 hojas, M1xN 1.9 hojas, M2xN 2.1 hojas, M1xBL 2.2 hojas, M2xB 1.5 hojas

En la variable longitud de vitroplantas el análisis de varianza nos muestra que el tratamiento M2 (Murashige y Skoog modificado IBT 2015) con la interacción de variedades fue el más adecuado siendo significativamente diferente frente al medio M1 (Miller y Ojima) dando como resultados promedios para Barranquino de 9.66cm, Napuri 9.19cm y Blanco 3.79cm, este resultado difieren con (Olivera, 2009). Menciona que el uso del medio MS con 0.5 mg. L⁻¹ de BAP y 0.1 mg. L⁻¹ de ANA en el establecimiento de diversos cultivares de ajo logró el desarrollo de plántulas con 50 a 60 mm de longitud en un período de ocho a diez semanas de cultivo

En la variable diámetro de microbulbillos el análisis de varianza nos muestra que hay una diferencia entre los medios el tratamiento M2 (Murashige y Skoog modificado IBT 2015) es el más adecuado obteniéndose promedios de M2B 6 cm, M2N 5.93cm y M2BL 2.62cm

En la variable peso de microbulbillos se reportan que la interacción M2 con las tres variedades dieron como resultado promedios para Barranquino 4.2gr, Napuri 4.8 gr y para Blanco 3.35 gr, siendo significativo frente al medio M1 con pesos menores este resultado difiere con Olivera (2009), en las variedades de ajo “Arequipeño” y “Napuri” ha determinado que él IBA en concentraciones de 2ML/L a 4 ML/L logró la mejor respuesta de las microplantas.

En la variable número de raíces el resultado del análisis de varianza nos muestra que el tratamiento 2 es significativo frente al tratamiento 1 dando promedios con las variedades para Barranquino 36 raíces para Napuri 10 raíces y para Blanco 3 raíces. Mientras que los valores arrojados por el tratamiento M2 (Murashige y Skoog modificado IBT 2015) dieron valores de Barranquino 4 raíces, para Napuri 4 raíces y para Blanco 0 raíces, este defiere con Ayerbe y Sagasta (1990), señalan que, en concentraciones elevadas de auxinas entre 0.6 y 1 ml/l, generalmente inhiben la formación de raíces, considerando que el tratamiento M1 (Miller y Ojima) tiene alta concentración de auxina

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que fue llevado el experimento se llegaron a las siguientes conclusiones:

1. se logró establecer el protocolo para la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo *in vitro* de tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*) para la formación de microbulbillos, considerando que la información encontrada del cultivo *in vitro* es antigua.
2. Se determinó que el mejor protocolo de desinfección para la multiplicación de los meristemos de las tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*), fue el tratamiento (T3) que consistió en una pre desinfección y desinfección dentro de cámara de flujo laminar, se sumergió 15 semillas en una solución de detergente por 10 minutos con 3 enjuagues con agua corriente, seguidos fueron sumergidos en una solución de bactericida (Phyton 1ml/l) por 20 minutos, se enjuagó 3 veces con agua corriente y se volvió a sumergir en una solución de fungicida (Benlate 1gr/100ml), por 20 minutos con enjuague de 3 veces con agua destilada. La desinfección consistió de eliminar capas envainadoras y fueron sumergidos en alcohol al 96° por 3 seg, se enjuago 2 veces con agua destilada estéril, seguido fueron sumergidos en hipoclorito de sodio al 2% por 20 minutos con 3 enjuagues, se eliminaron más capas envainadoras y se volvieron a remojar en lejía al 10 % por 10 minutos con 3 enjuagues, por último, se eliminaron hojas envainadoras extrayendo el domo meristemático con dos primordios foliares y se sembraron en tubos con Ms.
3. El mejor medio de cultivo para el establecimiento y multiplicación de las tres variedades de ajos (*Allium sativum. L*), fue el tratamiento M2 de Murashige y skoog modificado de (IBT 2015). Compuesto de cuatro tipos de medios de cultivo que son: Inicio (Ms Murashige modificado suplementado con sacarosa al 20 gr/l con

vitaminas Ms , citoquinina BAP 0.2 mg/l, con PH a 5.8; Proliferación (Ms de Murashige modificado suplementado con sacarosa al 20 gr/l con vitaminas Ms, citoquinina BAP 2 mg/l, con PH a 5.8 y agar 7gr/l; Pre bulbeo (Ms de Murashige modificado reducida a ¼ la cantidad de NH₄ NO₃ (412.5mg/l), con sacarosa 90 gr/l con vitaminas Ms, auxina ANA 0.5 mg/l, con pH 5.8 (Ms líquido); Bulbeo (Ms de Murashige modificado (IBT, 2015); reducida a ¼ la cantidad de NH₄ NO₃, (412.5mg/l), con sacarosa 140 gr/l con vitaminas adicionales, auxina ANA 2.0 mg/l, con pH 5.8 (Ms líquido); estos medios permitieron el buen desarrollo de plántulas y formación de microbulbillos con características fenotípicas de las plántulas *in vitro* con promedios aceptables en las tres variedades para Altura de planta Barranquino obtuvo (9.668), Napuri (9.187), Blanco Huaralino (3.786); para Número de hoja Barranquino obtuvo (4,5), Napuri (4), Blanco Huaralino (1.5): para Numero de Microbulbillos Barranquino obtuvo (5.4), Napuri (3.6), Blanco Huaralino (1.6); Diámetros Barranquino obtuvo (6.002), Napuri (5.930), Blanco Huaralino (2.62); para Peso de Microbulbillo Napuri (4.773 gr), Barranquino (4.191gr), Blanco Huaralino (3.348 gr) y por último el Número de Raíces Barranquino obtuvo (35.7), Napuri (9.5) Blanco Huaralino (2.6). A demás de presentar explantes vigorosos.

RECOMENDACIONES

De los resultados encontrados en el presente trabajo se desprende las siguientes recomendaciones:

1. Se recomienda utilizar el tratamiento M1 y M2 a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para la obtención de mayor número de microbulbillos *in vitro*.
2. Realizar estudios complementarios en la utilización de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento del grupo de las auxinas para mejorar la mayor producción de microbulbillos.
3. Realizar estudios de investigación en la fase de aclimatación dentro del invernadero para la obtención de microbulbillo y poder llevarla a campo.
4. El cultivo *in vitro* es una tecnología muy avanzada que se debe aplicar en el mejoramiento genético de plantas.

BIBLIOGRAFIA

- Ayerbe M.L. & J. Sagasta. (1990).** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, Editorial Mundi - Prensa. Madrid – España.
- Barba, A; Luna, B y Romero, J. (2001).** Micropropagación de plantas. Trillas. Distrito Federal de México .107.
- Brewster, James L.** Other Authors. C.A.B. International. Published. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, c1994. Physical Description. Xi, 236 p.
- Burba, J. (1992).** Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum. L.*). Producción, post cosecha, procesamiento y comercialización de ajo, cebolla y tomate Santiago de Chile: FAO, p. 63-126.
- Burba, J. (2003).** Adaptación del cultivo de ajos a temperaturas altas en Brasil reporte 17: 154-158.
- Bustamante M. A. & A. Muñoz. (1993).** In vitro culture of garlic in response to Cytokinins and auxin. *In vitro* cellular y Animal. Vol. 29/A N°3, Part III Journal of the tissue culture Association.
- Bustamante y Parra. (2010).** Adaptación de clones peruanos de ajos para su propagación *in vitro* Universidad Jorge Tadeo lozano Colombia.
- Bustamante, M. A. & L. Muñoz. (1993).** *in vitro* culture of Garlic in response to Cytokinins and auxin. *In vitro* Cellular y Animal. Vol. 29/A No. 3 Part III Journal of the tissue culture Association.
- Cabrera, Carmen y P. Eliot. (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.

- Cardenas, M, L. (1995).** tesis Cultivo In Vitro de Brotes de "Ajo" *Allium sativum L.* de Tres Variedades Obtenidas En Marín, N. L. México 2(8): 23-26.
- Carhuaricra et al, (2012).** Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad Morado Barranquito.
- Castillo, A. (2004).** Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: *in vitro*, INIA.
- Chaparro, C. (1998).** Avances en la estandarización de la metodología para el cultivo “*in vitro*” de (*Allium sativum. L*) var Rubi-1. Mosquera: Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias.
- Choi, S., J. Oh, J. Kim, J. Lim, D. Choi, B. Lee y D.U. Choi. (1992).** Meristem culture of (*Allium sativum. L*).
- Conci V.C. & A. Vilmas. (1991).** Virus free garlic (*Allium sativum L.*) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. J. Phytopathology 70-76 p.
- Conci V.C., D.N. Moriconi & S.F. Nome. (1986).** Cultivo de meristemos apicales de seis tipos de clones de ajo (*Allium sativum. L*). Phytun 46 (2):187-194.
- Conci, V., Cafrune, E., Lunello, P., Canvelli, A., Nome, S., Bracamonte, R., Alochis, P. y Perotto, M. (2007).** Incidencia de los virus en la producción de ajo y su control 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.
- Dodds, H. J., & Lorin, W. R. (1985).** Experiments in plant tissue culture etc=y.
- Escalante, B. (1988).** Cultivo *in vitro* de papa: principios y metodología. Editado por el Centro Internacional de la papa (CIP). Cajamarca-Perú.
- FAO. (1995).** Producción. Yearbook 84. — Roma: FAO, — p.139-141.
- FAO. (1990).** the occurrence of the species within the FAO fishing areas is tabulated. All scientific. FAO Fisheries Synopsis. No. 125, Vol. 10. Rome, 442P.

FAO. (1988). Intercambio y manejo de germoplasma *in vitro* de ajo. Santiago de Chile: FAO-INIA, Estación Experimental “La Platina”, 9 p.

Formation *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 33:231-235. Garlic (*Allium sativum*. L) 1. Effects of growth regulators through.

George and Sherrington. (1984). Plant propagation by tissue culture eversly, england; Eastern press p. 29-38.

Hartmann, H; Kester, F; Davies, F; Geneve, R. (1997). Plant propagation: Principles and practices. 6 ed. United States of América. 770 p.

Hartmann, H.T., Kester. (1998). 3602_propagacion_plantas.pdf - Keywords: fundamentales, involucrados, propagación, plantas, interés, camas, calientes, frías. sustratos., edición., propagación, plantas.

Hudson, T; Dale E. Kester. (1980). Propagación de plantas principios y prácticas, segunda edición, editorial continental SA México.

Hurtado, D; Merino, M. (1994). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, MX. 232 p.

INIA. (2004). producción de ajos en *in vitro* para un control fitosanitario Instituto Nacional de Investigación Agraria y Agroindustrial –INIAA. (1992). Alternativas equipamiento de Laboratorio *in vitro* y técnicas de micro propagación de plantas. Lima-Perú.

Izquierdo H. & O. Gómez. (2010). Informe de nuevas variedades crollo-3, un genotipo de ajo de elevada productividad. Cultivos tropicales, vol. 31. N°3, p.58 [http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/pdf/2010/3/\(3\)2010_58.pdf](http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/pdf/2010/3/(3)2010_58.pdf). Acceso 22/12/2011.

Jacques. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Institut National de la Reserche Agronomique (INRA), Francia. 236 pag.

- Jarret, R.L. (1991).** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis.
- Jiménez, E. (1998).** Cultivo de ápices y meristemas. p. 45-56. Pérez, J. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara: IBP, [b]. p390.
- Kim, Y. J., P. M. Hasegawa y R. A. Bressan. (1981).** In vitro propagation of hyacinth. HortScience 16 (5): 645-647.
- Kitto, S. L. (1997).** Commercial micropropagation. HortScience 32(6): 1-3.
- Koch, H. P. (1993).** Garlicin-factor fiction the antibiotic substance from garlic (*Allium sativum*). PhytotherapyRes. 7: 278-280.
- Kotlinska et al., (1990); koc. (1993). y Elliot. (1996).** Cultivo de ajos producción, importancia económica 10 (82): 8-17.
- Kotlinska, T. P.; P. N Aranek; M. N Avratill; L. Gerosimova; A.P Imakhov; S. N Iekouv. (1990).** Collecting Onion, Garlic and Wild Species of *Allium* in Central Asia. Plant. Genetic. Res. Newsletter 83/84: 31-32.
- Lindsey y Jones. (1994).** Multiplicación vegetativa y Cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi – Prensa. Madrid- España.
- Luna, R. (2002).** Micropropagación de algodón (*Gossypium barbadense*) var. Tanguis. Tesis Lic. Biol. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima 87.
- Margara, J. (1988).** Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* Madrid España .231.
- Matsubara and Chen. (1989).** Moriconi et al., (1990). The formation of multiple bulblets from single explant is the most desirable one. In vitro bulblet.
- Lindsey, K. (1992).** Biotecnología Vegetal Agrícola. / M. G. K. Jones. España: Editorial Acribia, 276 p.

- Mccollum, D. (1976).** Onion and allies; Allium (Liliaceae). En: Simmonds, N. W. (Ed.). Evolution of crop plants London: (S.N.), — p. 186-190.
- McKeand. (1981).** Therefore, clonal propagation of selected superior individuals is commonly advocated as an alternative to breeding.
- Mejía, R. (1994).** Agrobiotecnología, fundamentos y aplicaciones. Propagación comercia de 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*, la Molina Lima Perú. 364p.
- Minag. (2010).** Ministerio de agricultura Clasificación e importancia económica de especies del Perú, 25(12): 42 – 48. Disponible en <http://www.minag.gob.pe>.
- Minag. (2008).** Situación Actual de la producción de ajo. <http://www.minag.gob.pe/download/pdf/herramientas/boletines/ajo.pdf>. Acceso 10/09/2011.
- Minag. (2014).** <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=produccion-agricola>. Anuario Producción Pecuaria e Industria.
- Minitab Inc. (2017).** Minitab Statistical Software, Versión 13.2, USA.
- Mogollón. (2004).** Cultivares de ajos y su importancia económica. 42(2):12-20.
- Mohamed-Yasseen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE. (1995).** *In vitro* bulb Genet Resour Crop Evol41: 87-98 II.2 Cryopreservation of Apium.
- Montoya, L. (1991).** Cultivo de tejidos Vegetales. Medellín, CO, Universidad de Colombia. 168 p.
- Mujica et al., (2008).** Cultivo *in vitro* y técnicas para un mejor uso en laboratorio mediante cultivo de tejidos 23(3):67-84.
- Mujica H. & N. Mogollón. (2004).** bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum. L.*) con adición de citoquininas y sacarosa en el medio de cultivo. Bio agro 16(1):55-60.
- Mujica H., M.E. Sanabria, N. Mogollón & Y. Perozo. (2008).** Formación *in vitro* del bulbo del ajo morado (*Alium sativum L.*). Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2008, 25: 197-210.

- Murashige, T.; (1962).** A revised medium for rapid growth and bio – assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 15:473-497.
- 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.
- Nicho S.P., V.J. Loayza, J. B. Cahuas, & C. R. Cosme. (2005).** Descripción agronómica de cultivares de ajo (*Allium sativum. L.*) ssp. *Vulgare* bajo condiciones del valle de Huaral, Serie Boletín técnico N° 01-05, Lima – Perú. 12-13 p.
- Ochoa, A. (1990).** Establecimiento de cultivo *in vitro* en: fundamento teórico prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) Roma. 111pp.
- Olivera S.J. (2009).** Técnica de producción de semilla genética y básica de ajo (*Allium sativum. L.*) libre de virus, Serie Folleto N° 6-09, Lima – Perú. 2-10 p.
- P. Hudson T. (1995).** Biotecnología Agrícola, Segunda Edición, México.
- Pardo A., F. Luna & N. Hernández. (2011).** Regeneración *in vitro* de (*Allium sativum L.*). A partir de segmentos de hojas y raíces. *Bioagro* 23(3):207-214.
- Parra F., M. (2006).** Desarrollo de tecnologías para la producción de semilla pre básica indexada de Ajo (*Allium sativum. L.*) var. Rubil y Criollo en el laboratorio de Micropropagación de plantas de CORPOICA C.I Tibaitatá del municipio de Mosquera Cundinamarca. (Tesis Pregrado).
- Parrot et al., (1991).** We studied the nesting biology of the Green-rumped Parrotlet (*Forpus passerinus*) in the llanos of Venezuela. Clutch size averaged 7 eggs (range: 5-10), and eggs were typically laid daily or every other day over 7-16 days (\bar{x} = 10). Incubation began with the first egg.

- Pateña, L.F., S.M. Rasco-Gaunt, V.P. Chávez, A.L. Bariring y R. Barba; Pérez, J. N. (1998).** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Pierik, R, L, M. (1990).** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores editorial Mundi-prensa Madrid, España 326p.
- Pinzón. (2009).** Cultivo de ajos desde la siembra hasta la cosecha, pautas para una mejor producción Arequipa –Perú.
- Rauber, M. & J. Grunwaldt. (1988).** *In Vitro* regeneration in *Allium sativum* y *Allium cepa*.
- Ravnikar et al., (1993).** *In Vitro* bulblet formation has been achieved with various explants including shoot tip, basal plate and bulb scale.
- Roca W, Mroginski M. (1991).** Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia): CIAT; [consultado 2016 Sep 18] [.https://books.google.hn/](https://books.google.hn/).
- Roca. W., Mroginsky, L. A. (1991).** Editores técnicos. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Publicación CIAT N° 151 Cali – Colombia.
- Roca, W; Mroginski, L. (1991).** Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones. Cali, CO. 969 p.
- Rojas, M. (2001).** Aclimatación de micro plántulas de tuna (*Opuntia ficus indica*). Tesis Ing. Agrónomo. Lima, PE, UNALM. 78p.
- Rusell, P. (1999).** Functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast, cel 45. 145-1453.
- Salinas, R. (1988).** Cultivo *in vitro* de embriones de camote (*Ipomoea batatas* Lam). Tesis Mag Sc. Lima, PE, UNALM. 89 p.

Savón, J. R.; A. A Yal A y D. Lordanov. (1987). Influencia de la distancia entre plantas y fechas.

Savón y Marrero. (1997). Cultivo de tejidos en agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia): CIAT; consultado 2016 Sep 18.https://books.google.hn/books?id=EXijYNw55DUC&dq=sulfato+de+adenina+en+produccion+in+vitro&hl=es&source=gbs_navlinks_s.

Seed production and *in vitro* conservation systems for garlic and shallot. Acta Hort. 461: 503-513.

Terán O. (1990). El cultivo de ajo: Semilla.1ª ed. Bolivia: Centro de Información para el Desarrollo.59p.<https://books.google.hn/books?id=SO9JImT>.

Torres, M.A.; A. Font; O. Llorente; V. Moreno y A. J. Rodríguez. (2007). Estrategias para la conservación *in vitro* de ajo (*Allium sativum. L.*). En Cuba. Convención Trópico 2008. Ciudad de La Habana, Cuba. 866-878.

Ulrich, M., F. T. Davies, Y. C. Koh, S. A. Duray y J. N. Egilla. (1999). Micropropagation of Crinum ‘Ellen Bosanquet’ by tri-scales. Scientia Hort. 82: Universidad de Nuevo León-México.<http://eprints.uanl.mx/7449/1/1020112167.PDF>.

Vargas, J. (1982). Aplicación del cultivo de tejidos en la propagación vegetativa de especies forestales. Ciencia Forestal 7(39): 44-63.

Vejarano y Martínez. (1983). Uso adecuado de hormonas en cultivo *in vitro* 8(22): 11-18.

Villalobos, V.M. y Torpe, T.A. (1991). Micropropagacion; concepto, metodología y resultados. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Roca, W.M. y Mrogrinski, L, A. (Eds), Cali, Colombia, PP., 127-142.

Villarroel, G; Pierre, J; Leigue, L. (2010). Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Multiplicación y Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Cochabamba, BO. 134 p.

Yadav, (1995); Hoque *et al.*, (1996). Directa efficient plant regeneration from leaf explants of solanum tuberosum L, CV, bintje. plants cell reports 14:645-647.

Zel, J., N. Debeljak, R. Ucman y M. Ravnikar. (1997). the effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum. L*). cv. Ptujski Jesenski) bulb.

ANEXOS

Matriz de Consistencia

Multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo in vitro de 3 variedades de ajos (*Allium sativum*.L) para la formación de microbulbillo

PROBLEMA	OBJETIVOS GENERAL	PLANTEAMIENTO DE HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES
<p style="text-align: center;">GENERAL</p> <p>¿Cómo establecer la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo <i>in vitro</i> de tres variedades de ajos (<i>Allium sativum</i>. L) para la formación de microbulbillo?</p>	<p style="text-align: center;">GENERAL</p> <p>Establecer la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo <i>In Vitro</i> de tres variedades de ajos (<i>Allium sativum</i>. L) para la formación de Microbulbillos</p>	<p>H0: ninguno de los tratamientos planteados nos dará el mejor resultado</p>	<p>Variable dependiente</p> <p>Multiplicación in vitro de tres variedades de ajos para la formación de microbulbillos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje en la eficiencia en la desinfección <ul style="list-style-type: none"> • Altura de planta • Numero de hojas • Número de microbulbillos • Numero de hojas • Longitud de Vitroplanta • Diámetro de Microbulbillo • Peso de Microbulbillos • Numero de raíces.
<p style="text-align: center;">ESPECÍFICO</p> <p>¿Cómo determinar el mejor medio de cultivo para la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo in vitro de tres variedades de ajos (<i>Allium sativum</i>. L) para la formación de microbulbillos</p> <p>¿Cómo evaluar la efectividad de los medios de propagación in vitro de las 3 variedades de ajos, para la formación de microbulbillo</p>	<p style="text-align: center;">OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <p>Determinar el mejor medio de cultivo para la multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo in vitro de tres variedades de ajos (<i>Allium sativum</i>. L) para la formación de microbulbillos</p> <p>Evaluar la efectividad de los medios de propagación in vitro de las 3 variedades de ajos (<i>Allium sativum</i>. L) para la formación de microbulbillos</p>	<p style="text-align: center;">HIPOTESIS ESPECIFICO:</p> <p>Ha: por lo menos unos de los tratamientos planteados nos dará mejor resultado</p>	<p>Variable independiente</p> <p>Estandarización de un protocolo in vitro <i>in vitro</i> del mejor medio de cultivo para la formación de microbulbillos de tres variedades de ajos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Diámetro de Microbulbillo • Peso de Microbulbillos • Numero de raíces.

Sales Minerales de Murashige y Skoog (1962)

Constituyentes	Mg / lt
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes:	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7h ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₃ EDTA	37.3
Vitaminas	
Myo – Inositol	100
Glycina	2
Acido Nicotínico	0.5
Pirodoxina	0.1
Tiamina	0.1
Otros compuestos orgánicos:	
Sacarosa	20 gr/l
Agar	7gr/l

Sales Minerales de Gamborg Miller y Ojíma (1968)

Constituyentes	Mg / lt
Macronutrientes	
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
KNO ₃	2500
MgSO ₄	250
CaCl ₂ .aq	150
KH ₂ PO ₄	0.15
Micronutrientes:	
KI	0.75
H ₃ BO ₃	3.0
MnSO ₄ .H ₂ O	10.0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Na ₂ .EDTA	37.3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
Vitaminas	
Myo – Inositol	100
Acido Nicotínico	1
Pirodoxina	1
Tiamina	10
Otros compuestos orgánicos:	
Sacarosa	20
Agar	7 gr/l
pH	5.5

Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M1 (Barranquino)

M1	BARRANQUINO					
Explant	Numero de Microbulbillos /Planta	Numero de Hojas	Longitud de Vitroplantas	Diámetro de Microbulbillo	Peso de Microbulbillos gr	Numero de Raíces
1	2	5	4.0	5	3.44	4
2	2	5	5.4	5.2	3.37	4
3	2	5	6.3	6.4	4.1	5
4	2	7	5.0	4.5	3.67	4
5	3	4	6.4	5.5	5.1	4
6	0	0	0	0	0	0
7	3	7	5.7	5	5.3	5
8	0	0	0.0	0	0	0
9	3	5	5.7	6.4	4.88	6
10	3	7	6.0	6.7	5.33	6

Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M1 (Napuri)

M1	NAPURI					
Explant	Numero de Microbulbillos /Planta	Numero de Hojas	Longitud de Vitroplantas	Diámetro de Microbulbillo	Peso de Microbulbillos gr	Numero de Raíces
1	2	2	6.0	2.4	2.71	8
2	2	3	5.6	3.67	2.45	6
3	1	2	6.5	2.76	1.23	5
4	1	3	7.0	2.2	1.33	4
5	2	3	6.5	3.4	2.33	6
6	0	0	0.0	0	0	0
7	1	3	4.0	2.56	1.12	5
8	0	0	0.0	0	0	0
9	0	0	0.0	0	0	0
10	1	3	5.8	3	1.1	4

Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M1 (Blanco Huaralino)

M1	BLANCO HUARALINO					
Explante	Número de Microbulbillos /Planta	Número de Hojas	Longitud de Vitroplantas	Diámetro de Microbulbillo	Peso de Microbulbillos gr	Número de Raíces
1	2	3	4.0	3	2.34	0
2	0	0	0.0	0	0	0
3	1	3	4.5	1.1	1.12	0
4	1	2	5.0	1	2.21	0
5	0	0	0.0	0	0	0
6	1	2	5.0	2.1	1.21	0
7	3	3	5.6	3.2	5.34	2
8	2	2	5.0	3.1	2.2	0
9	2	3	5.8	2.89	3.1	0
10	2	3	6.0	2.94	4	0

Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M2 (Barranquino)

M2	BARRANQUINO					
Explante	Número de Microbulbillos /Planta	Número de Hojas	Longitud de Vitroplantas	Diámetro de Microbulbillo	Peso de Microbulbillos gr	Número de Raíces
1	6	3	5.15	5	2.76	20
2	6	5	6.44	6	4.76	40
3	6	7	8.44	6.5	5.26	36
4	6	4	6.8	7	4.17	46
5	5	5	10.4	5.8	3.25	42
6	5	5	13	5.5	2.35	25
7	5	4	14.5	5	4.80	35
8	5	3	10.2	6.3	4.65	40
9	5	3	9	6.42	5.64	33
10	5	1	12.75	6.5	4.27	40

Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M2 (Napuri)

M2	NAPURI					
Explante	Número de Microbulbillos /Planta	Número de Hojas	Longitud de Vitroplantas	Diámetro de Microbulbillo	Peso de Microbulbillos gr	Número de Raíces
1	4	3	13.2	6.5	3.31	8
2	4	2	7.54	6	2.56	6
3	4	2	10.1	6.4	4.23	8
4	4	1	9.54	6.9	5.85	10
5	4	2	8.3	7.5	6.50	8
6	3	1	5.9	5	3.65	11
7	3	2	9.05	6	3.20	15
8	2	2	10.04	5	5.69	16
9	4	3	8.56	2	5.07	6
10	4	3	9.64	8	7.67	7

Datos Registrados de Ajos en el Tratamiento M2 (Blanco Huaralino)

M2	BLANCO HUARALINO					
Explante	Número de Microbulbillos /Planta	Número de Hojas	Longitud de Vitroplantas	Diámetro de Microbulbillo	Peso de Microbulbillos Gr	Número de Raíces
1	3	0	0	0	2.73	0
2	2	2	9.74	3	6.32	0
3	0	0	0	0	0	0
4	3	4	6.32	4	3,33	0
5	2	2	3.33	5	6	10
6	0	0	0	0	0	0
7	2	2	2.87	4	5.4	5
8	0	0	0	0	0	0
9	2	3	7.6	4.3	5.7	6
10	2	2	8	3.9	4	5

Foto 01: Semillas de las tres variedades de ajos



Foto 02: Introducción de los explantes



Foto 03: Corte de plántulas de ajos



Foto 04: Meristemas de ajos expuestos



Foto 05: Meristemos listos para la siembra



Foto 06: Meristemos sembrados

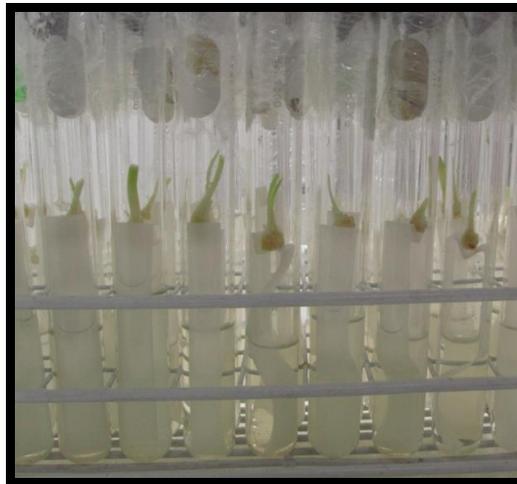


Foto 07: Meristemos en crecimiento



Foto 08: Plántulas de ajos ya diferenciados

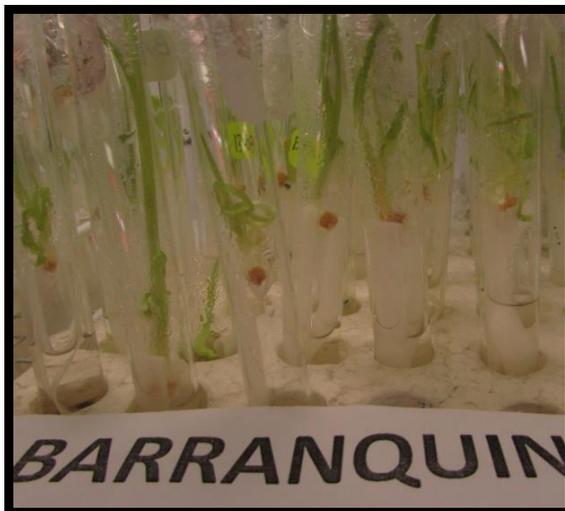


Foto 09: Plántulas en etapa de pre bulbeo



Foto 10: Plántulas de ajos en etapa de pre bulbeo en agitación Shakers



Foto 11: Plántulas en etapa de Bulbeo



Foto 12: Plántulas de ajos bulbeados y enraizados



Foto 13: Plántulas de ajos Barranquino



Foto 14: Plántulas de ajos con microbulbillos formados Barranquino

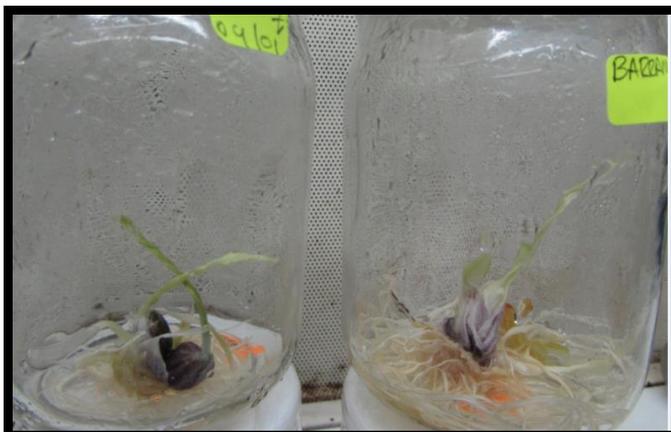


Foto 15: Cosecha de plántulas de ajos con microbulbillos formados variedad

Barranquino



Foto 16: Plántulas de ajos variedad Napuri en etapa de bulbeo

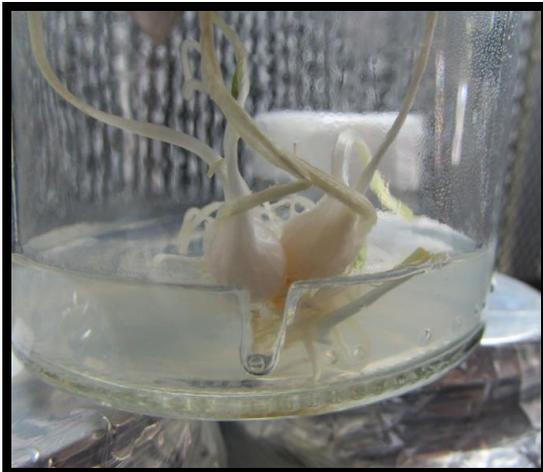


Foto 17: Plántulas de ajo variedad Blanco Huaralino en etapa de bulbeo



Foto 18: Plántulas de ajo de las tres variedades cosechados



Foto 19: Evaluación de plántulas de ajos cosechados



Foto 20: Longitud y peso de plántulas de ajos cosechado



Foto 21: Balanza Analítica y Bernier para evaluaciones

