

00361

23
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

" Análisis preliminar para bancos activos
de germoplasma de Allium sativum L.
in vitro "

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A
LAURA MIRANDA TAPIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	pág.
ABREVIATURAS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 CONSERVACION DE GERMOPLASMA	5
2.1.1 Generalidades de la conservación de germoplasma	5
2.1.2 Almacenamiento de semillas ortodoxas, recal- citrantes y plantas de propagación vegetativa.	10
2.1.3 Conservación de germoplasma <i>in vitro</i>	12
2.1.4 Bancos de germoplasma <i>in vitro</i>	15
2.2 <i>Allium sativum</i> L.	17
2.2.1 Descripción botánica de <i>Allium sativum</i> L.	17
2.2.2 Clasificación	18
2.2.3 Historia, propiedades medicinales y nutritivas.	19
2.2.4 Fisiología del desarrollo del ajo	21
2.2.5 Importancia económica en México	24
2.2.6 Enfermedades y plagas	25
2.3 PROPAGACION <i>in vitro</i> .	26
2.3.1 Generalidades de la propagación <i>in vitro</i> de bulbos.	26
2.3.2 Eventos morfogenéticos <i>in vitro</i> en <i>Allium</i> <i>sativum</i> L.	27
2.3.3 Importancia de la propagación <i>in vitro</i> de <i>Allium sativum</i> L.	30
2.3.4 Estabilidad genética en cultivos de <i>Allium sativum in vitro</i> .	31
2.4 REDUCCION DEL CRECIMIENTO POR INDUCTORES DE ESTRES OSMOTICO Y POR BAJAS TEMPERATURAS.	33
2.4.1 Retardo de crecimiento por efecto de sacarosa y manitol en cultivos <i>in vitro</i>	34
2.4.2 Retardo de crecimiento por bajas temperaturas en cultivos <i>in vitro</i> .	37

2.5	PIQUEROL A	39
2.5.1	Estructura y Propiedades químicas del piquerol	39
2.5.2	<i>Piqueria trinervia</i> Cav.	40
2.5.3	Propiedades medicinales del piquerol A	42
2.5.4	Potencial alelopático de piquerol A	42
3.	OBJETIVOS	44
4.	MATERIALES Y METODOS	45
4.1	Material biológico	45
4.2	Desinfección y aislamiento de adices	45
4.3	Siembra	46
4.4	Condiciones de incubación	48
4.5	Medio de cultivo	48
4.6	Evaluación del desarrollo	51
4.7	Planteamiento general de los experimentos	52
4.8	Tratamiento estadístico y programas de computación.	55
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	56
6.	CONCLUSIONES	86
7.	BIBLIOGRAFIA	137
	APENDICE I	

ABREVIATURAS

ABA	Acido abscísico
AIA	Acido 3-indolacético
AIB	Acido indolbutírico
ANA	Acido- α -naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
BAGIV	"Banco activo" de genes <i>in vitro</i>
BBGIV	"Banco base" de genes <i>in vitro</i>
BGIV	Banco de genes <i>in vitro</i>
CIP	Centro Internacional de la papa
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical.
C. V.	Coefficiente de variación
D. E.	Desviación estandar
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
ZiP	6-(γ - γ -dimetilalilamina)-purina
E. E.	Error estandar
F I	Fase I (tratamiento)
F II	Fase II (recuperación)
IBPGR	International Board for Plant Genetic Resources
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
K	6-furfurilaminopurina (cinetina)
MS	Medio de cultivo Murashige-Skoog (1962)
N. S.	Nivel de significancia
UNPH	Union Nacional de Productores Hortícolas
Z	6-(4-hidroxi-3-metil-but-2-enilamina)-purina (zeatina)

RESUMEN

En el presente trabajo se intentó retardar el crecimiento de ápices de ajo (*Allium sativum*) para establecer las condiciones que favorezcan el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* a corto-mediano plazo.

El medio utilizado fue el MS a la mitad de concentración de sales sin hormonas con 7% de agar. Se probaron inductores de estrés osmótico (sacarosa y manitol), (4°C) y un terpeno natural (piqueral A) el cual ha sido reportado como alelopático. Las condiciones de incubación fueron 27°C, 2000 lux y fotoperiodo de 16 hrs., y 4°C.

La sacarosa no ejerció una presión osmótica importante, debido, probablemente, a una rápida metabolización, recayendo casi toda el efecto osmótico sobre el manitol, el cual sí mostró fuertes efectos de estrés, los cuales perduraron después del tiempo de recuperación (2 meses). De los resultados obtenidos en esta fase, se pudo concluir que una buena opción de tratamiento es una baja concentración de manitol (3 y 5%) que no ejerce un efecto tóxico y sí presentó un claro estrés osmótico. La temperatura de 4°C mostró un efecto de limitación del metabolismo de los explantes durante 13 meses de almacenamiento, al recuperarse después este lapso, reiniciaron su crecimiento mostrando su potencialidad para los fines de este proyecto. El efecto combinado de manitol y sacarosa, a bajas temperaturas, redujo sustancialmente el metabolismo y permitió, transcurrido ese lapso, reasumir

exitosamente el crecimiento.

El piqueral A sí mostró producir limitación de crecimiento en los explantes, encontrándose como sustancia interesante que requiere de más estudios para su posible aplicación como inhibidor de crecimiento de cultivos *in vitro*.

Un claro efecto de la edad fisiológica del explante se hizo aparente en los experimentos, destacándose tres etapas fisiológicas, A0 (metabolismo atenuado o basal en ajos de reciente cosecha), A1 (metabolismo en fase de arranque de la germinación) y A2 (metabolismo acelerado en pleno proceso de germinación). Estos hechos demostraron que tienen un significado que hay que explorar en el proceso de almacenamiento de germoplasma.

1. INTRODUCCION

En la última década, se le ha dado gran importancia al problema de la conservación de germoplasma de muchas especies, tanto comestibles como especies potencialmente útiles para esta y otras necesidades humanas (IBPGR, 1986 a), debido a que actualmente se le ha dado atención a la grave alteración que han sufrido las comunidades vegetales por el desmedido aumento de las poblaciones humanas, las cuales deterioran el medio ambiente a una velocidad acelerada, esto resulta crítica, especialmente en los países tropicales, con la consecuente pérdida de hábitats naturales. Además la ciencia está descubriendo nuevos usos de la diversidad biológica, para mitigar tanto el sufrimiento humano como la destrucción del medio ambiente por lo que todo esto en su conjunto muestra la urgencia de preservar la diversidad genética (Wilson, 1988).

Existen especies cuyas semillas se caracterizan por ser de fácil almacenamiento en condiciones de baja temperatura y humedad relativa (ortodoxas), sin embargo, existe otro grupo de especies cuyas semillas presentan serios problemas para su almacenamiento bajo las condiciones antes señaladas (recalcitrantes: papaya, mango, mamey, etc.), (Roberts y King, 1980), en la mayoría de los casos son de clima tropical.

Por otro lado, existe una gran cantidad de plantas cuyo sistema de propagación usual es la vía asexual o vegetativa.

El almacenamiento de estas plantas (germoplasma) se hace a través del establecimiento de cultivos en el campo, lo cual no sólo redundaría en un costo elevado, sino que también, plantea riesgos de pérdida total del material que se desea preservar, como ejemplos tenemos los cultivos de papa, ajo, camote, freisa, etc. todo esto nos lleva a buscar técnicas alternativas que faciliten la propagación clonal y masiva de plantas con genotipos seleccionados y al mismo tiempo que permita la preservación de este germoplasma valioso por períodos largos de almacenamiento.

Tanto para las semillas recalcitrantes y para las plantas de propagación vegetativa, las metodologías de (CTV) se presentan como una opción viable en la preservación de germoplasma valioso, ya que en ninguno de los dos casos, los métodos convencionales de almacenamiento, responden a todas estas necesidades (Withers, 1980; Rubluo, 1985). Las ventajas que la preservación *in vitro* ofrece en estos casos son:

a) un gran número de clones pueden preservarse en un espacio reducido, b) se elimina el problema de plantas infectadas y c) los costos son abatidos una vez iniciado el sistema (Murashige, 1974; Rubluo, 1985).

La preservación *in vitro* se puede realizar por dos vías: a) corto-mediano plazo en la que se limita el crecimiento de las plántulas *in vitro* mediante bajas temperaturas, inductores de estrés osmótico, etc., y b) la vía del largo plazo en la que los tejidos se almacenan a temperaturas superbajas (-196°C) en

nitrógeno (N₂) líquido.

Aunque ya existen trabajos sobre compuestos químicos y condiciones físicas dirigidos a retardar el crecimiento para almacenamiento de germoplasma, IBPGR, 1986 a (ver abreviaturas) recomendó profundizar en el estudio de éstas con el fin de hacer posible la conservación de material genético valioso en la vía "corta-mediana plaza". Estas son las inhibidoras de crecimiento (ABA, CCC, ácido acético salicílico, etc.), grupos de compuestos con potencial inhibitorio, inductores de estrés osmótico (sacarosa, manitol, sorbitol, etc.) con los cuales se han encontrado respuestas favorables en la inhibición de crecimiento, y condiciones físicas como son las bajas temperaturas (Staritsky, 1980).

Por lo anterior, en el presente trabajo se probó *in vitro*, el terpeno natural piqueral A, obtenido de la planta *Piqueria trinervia* Cav., reportado como inhibidor de la germinación de semillas de especies que crecen en el mismo hábitat (Romo et al., 1970) y cuyo estudio fue interesante para una posible aplicación en cultivos de tejidos.

El IBPGR en su reporte de enero de 1986 a, hace algunas recomendaciones para el diseño, planeación y operación de un banco de genes *in vitro* (BGIV). Señalan que actualmente son pocos los trabajos hechos sobre técnicas de interés para el desarrollo de sistemas de conservación genética *in vitro*; también indicó, que la conservación de tipos particulares deseables para lograr un mejoramiento de acuerdo a las necesi-

dades a largo plazo son trabajos que requieren de atención inmediata.

Por otro lado la especie *Allium sativum* L., ajo, es un especie apomíctica obligada, y en raras ocasiones llega a producir semillas las cuales en la mayoría de los casos son estériles (Hartman y Kestler, 1982; Novák et al., 1986). El bulbo es utilizado como semilla agronómica y sólo se mantiene en condiciones de almacenamiento por un periodo corto que va de seis a ocho meses, tiempo que dura su latencia, posteriormente se establece en el campo para su propagación vegetativa y nuevamente la semilla agronómica producida se cosecha y se almacena por otro periodo igual, así se conservan las líneas de interés agronómico de *A. sativum* L.

Las características que presenta el ajo lo hacen de gran interés para tomarlo como modelo para el establecimiento de una colección activa de germoplasma (vía corto-mediano plazo) utilizando bajas temperaturas (4°C), inductores de estrés osmótico (manitol y sacarosa) y un terpeno (piquerol A) del cual se sabe que posee un potencial alelopático (González et al., 1981).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Conservación de germoplasma *in vitro*.

2.1.1. Generalidades de la conservación de germoplasma.

Por el rápido aumento de la población, ha sido necesario implantar técnicas agronómicas modernas de explotación, como son el mejoramiento genético de plantas útiles para el hombre y el mejoramiento de las prácticas agrícolas, con el fin de abastecer las necesidades alimenticias de la población mundial.

Tales técnicas han generado plantas mejoradas, altamente homogéneas provocando la reducción de la variabilidad genética de las especies cultivadas, que ha llevado a una "erosión genética", es decir, la pérdida de la plasticidad en la respuesta del genoma frente a las alteraciones ambientales (Plucknett 1983). Esta situación se explica por la acción de gobiernos y compañías privadas que al contar con plantas de características mejoradas (resistencia a ciertas enfermedades o bien algunas propiedades funcionales, etc), las introducen para su cultivo extensivo resultando en el desplazamiento y pérdida de las plantas originales (plantas silvestres y variedades regionales) en función de los nuevos materiales "mejorados" (Blanco, 1985).

En muchos casos se ha tenido la experiencia de la introducción de una variedad mejorada, si bien, a veces resuelve un problema específico, por ejemplo la incidencia de una plaga

determinada, con frecuencia sucede que a pesar de tenerse controlada la respuesta a dicha plaga, se presenta una plaga diferente bajo una condición distinta a la cual la variedad resulta sensible.

En tales casos, nos encontramos con que si no se ha tenido la precaución de conservar el material genético original, por un lado, se ha perdido una línea que representaba siglos de evolución (Blanco, 1985) y por otro lado se presenta la dificultad de obtener material mejorado que responda a las necesidades de alimentación que se presenten en un determinado momento.

Hasta ahora, aún con los avances de la Genética, no ha sido posible construir un gen. Estos se pueden recombinar y aún transferir de la célula de una especie a la célula de otra totalmente distinta; es posible mutar y aún multiplicar genes *in vitro*, pero hasta este momento no se sabe construir un gen con determinadas características como por ejemplo resistencia en el trigo a temperaturas por debajo de cero grados centígrados o bien, cómo hacer que una semilla produzca proteínas con una mejor composición de aminoácidos. Si no se cuenta con genes de alguna planta, no se puede lograr la producción de un nuevo material con esas características (Blanco, 1985).

Algunos ejemplos de "erosión genética" son el caso del arroz en la India que en los últimos 50 años ha cultivado más de treinta mil diferentes tipos de arroz, sin embargo, el Dr. H. K. Jain, director del Indian Agricultural Research Institu-

te de Nueva Delhi, predice que de acuerdo con las enormes pérdidas que se han registrado, en menos de 15 años no contarán con más de 50 variedades. Otro cultivo de gran importancia es el maíz, del cual se redescubrió en 1978. La especie *Zea diploperennis*, un pariente del maíz que era cultivada por una familia de campesinos, en la Sierra de Manantlán, Jalisco, que no se veía desde 1920. Es resistente a cuatro de la siete plagas más importantes de esta planta, ofreciendo así, grandes expectativas para los fitomejoradores. En Turquía se contaba con cientos de líneas de betabel que han ido desapareciendo a partir de la introducción de un tipo de alto rendimiento.

Grecia ha perdido el 95 % de sus variedades de trigo y en Africa del Sur prácticamente han desaparecido todas las razas de sorgo por la introducción del híbrido texano de alto rendimiento (Blanco, 1985).

La conservación de una amplia gama de diversidad genética en muchas especies vegetales se realiza a través del almacenamiento de semillas (IBPGR, 1984 a).

La creación de bancos genéticos fueron iniciados a principios de este siglo por el genetista soviético V. L. Vavilov, fundador del primer Instituto para la conservación de germoplasma (Instituto de la Unión para la industria de las plantas), quien recorrió el mundo y señaló distintas zonas de diversidad genética, entre las que se encuentran México y otros países en vías de desarrollo (Blanco, 1985).

Desde que Vavilov inició sus trabajos de reconocimiento de

los "centros geográficos de diversidad genética", la importancia de la exploración, colecta, utilización y conservación del material genético valioso, ha sido cada vez más reconocida como una necesidad imperiosa de salvaguardar la fuente natural de la variación hereditaria. De lo anterior podemos destacar, en forma breve, la importancia que tienen los "materiales o recursos genéticos valiosos". Con todo esto, podemos afirmar que su estudio es y será cada vez de mayor interés para las necesidades agrícolas, industriales, medicinales, etc. del presente y del futuro en el mundo (Rubluo, 1985).

La estrategia de conservación de germoplasma valioso, depende de la naturaleza del material biológico, y está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción, el tamaño de los individuos y el estatus ecológico (silvestre o domesticado). De acuerdo con estas características se han intentado diversos métodos de conservación, los cuales van desde el tradicional banco de semillas, hasta el mantenimiento de áreas de reserva para la conservación de muchas especies útiles para el hombre como son: los árboles frutales, árboles maderables, especies cultivadas en las regiones tropicales y especies propagadas vegetativamente (Simmonds, 1980).

En muchos casos el almacenamiento no es factible y en otros resulta prohibitivo por su alto costo y por el riesgo de pérdidas debidas a la manipulación o por desastres naturales. De aquí que se ve la necesidad de implantar nuevas estrategias para preservar los recursos genéticos de una manera más efi-

ciente.

Por lo anterior, se concluyó en el Seminario Internacional titulado "Plant Genetic Conservation-Recalcitrant Seed and Tissue Culture" realizado en Inglaterra en 1980, que es importante acelerar la investigación de los recursos genéticos vegetales que no pueden ser preservados por las técnicas de almacenamiento conocidas en la actualidad, como son los casos de las semillas recalcitrantes y especies propagadas clonalmente (Williams y Withers, 1980).

Desde el punto de vista de la conservación genética, Simmonds (1980) hace una distinción de tres categorías de cultivos que necesitan ser atendidos:

- i) Las plantas anuales.-La mayoría son intracruzadas (autógamas), se propagan por semilla las cuales pueden ser almacenadas en frío y en seco.
- ii) Plantas leñosas.- Perennes, con entrecruzamientos (alógamas), no son, o todavía no pueden ser clonados, sus semillas son característicamente de vida corta y no pueden ser almacenadas por la vía tradicional.
- iii) Plantas herbáceas o leñosas.- Con entrecruzamientos se propagan clonalmente y su conservación se realiza a través de siembra y cosecha (Simmonds, 1980).

Como puede observarse, se requieren de metodologías adecuadas para la conservación de estos grupos de plantas. Al hacer una evaluación de los avances de las técnicas de cultivo de

tejidos vegetales en la aplicación de la conservación genética *in vitro*, se vió que tienen una aplicación potencial en la conservación de los dos grupos de plantas antes señaladas.

2.1.2 Almacenamiento de semillas ortodoxas, recalcitrantes y plantas de propagación vegetativa.

La mayoría de las células y tejidos contienen una proporción relativamente alta de agua. Esto parece esencial para el metabolismo normal. La desecación generalmente da como resultado la muerte. Muchos organismos han utilizado propágulos desecados de una clase u otra como medio de dispersión o como un medio de sobrevivencia a su medio ambiente. En estas condiciones se son capaces de vivir o de permanecer viables por períodos relativamente largos, bajo condiciones mediante las cuales el organismo progenitor no puede sobrevivir, ejemplos: esporas de bacterias, hongos, algas, briofitas, pteridofitas y los propágulos más grandes y más complejos que son las semillas de gimnospermas y angiospermas que se desecan cuando están maduras.

Las semillas que son capaces de secarse a niveles de humedad del 5% o menores sin sufrir daño y pueden alcanzar temperaturas bajas hasta de -20°C sin sufrir daño, han sido descritas como ortodoxas con respecto a su comportamiento en almacenamiento (IBPGR, 1974; Roberts, 1973). Con un contenido de humedad del 18 al 20%, es suficiente para disminuir dramática-

mente su periodo de almacenamiento (Roberts y King, 1980), ejemplos de semillas ortodoxas son el maiz, el frijol, el trigo, la avena, las semillas oleaginosas, etc. (IBPGR, 1986 b).

Por otro lado, existen algunas semillas que no pueden almacenarse bajo las condiciones antes señaladas ya que sufren daño subcelular en sus tejidos y mueren rápidamente; a estas semillas Roberts las llamó "semillas recalcitrantes" (Roberts, 1973), ejemplos de semillas recalcitrantes son las del té, café, cacao, manzana, pera, etc. (IBPGR, 1986 b).

Las semillas recalcitrantes son de vida corta, aún en condiciones de humedad adecuadas a su sobrevivencia. Tal periodo va de algunas semanas a algunos meses, con excepción de *Citrus* y el café los cuales se han logrado almacenar por algunos años (Roberts y King, 1980), algunos ejemplos de plantas con semillas recalcitrantes son: el té, café, cacao, manzana, pera, uvas, olivos, etc. (IBPGR, 1986 b).

Existen plantas tales como la papa, el camote, la yuca, el ajo y otras más que necesitan sembrarse y cosecharse en cada estación. Este proceso continuo de siembra y cosecha, trae graves riesgos de pérdida, ya que están expuestas más continuamente a enfermedades, desastres naturales o provocadas por el mismo hombre, errores humanos en el manejo y marcaje, y dificultades de almacenamiento. En la práctica se vuelve imposible plantar y cosechar un gran número de genotipos cada año y al mismo tiempo mantener un nivel satisfactorio de integri-

dad genética. A esto hay que agregar el alto costo del mantenimiento de tan grandes colecciones para poder tener una base permanente (Hawkes, 1980).

Tales colecciones necesitan ser transformadas en semillas verdaderas para mantener una colección de semillas. Cuando ésto no sea posible debido a la alta esterilidad o a la necesidad de almacenar genotipos exactos, entonces los métodos *in vitro* deberán ser la respuesta a este problema; IBPGR (1986 b) en su reporte recomienda estas técnicas de cultivo *in vitro* para aumentar el "pool" genético de especies que tienden a ser estériles como es el caso del ajo dentro del género *Allium*.

2.1.3 Conservación de germoplasma *in vitro*.

De lo anterior, se puede destacar la urgencia de conservar los recursos genéticos valiosos tanto de plantas cultivadas como de plantas potencialmente útiles (silvestres).

La conservación de germoplasma valioso se ha planteado como una medida inaplazable y prioritaria (Rubluo, 1985). El estudio y la utilización de los recursos genéticos vegetales se efectúa en forma terminal a través de los bancos de germoplasma, los cuales en su mayoría son tradicionales (con baja humedad relativa y bajas temperaturas) en los que se almacenan principalmente semillas como son el maíz, trigo, frijol, oleaginosas, etc. Las plantas con semillas recalcitrantes y las plantas de propagación vegetativa por sus características bio-

lógicas se dificultan se impide su almacenamiento en forma tradicional. Por esto, ha sido necesario buscar alternativas que permitan la conservación de estas especies como son las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Estos métodos tienen una amplia aplicación en el conocimiento y la explotación de los recursos genéticos. Así la propagación masiva, el intercambio de germoplasma, la inducción de la variabilidad genética y la recuperación de plantas en peligro de extinción, son sólo algunas de las posibilidades que el sistema ofrece para utilizar mejor los recursos genéticos vegetales (Rubluo y Kartha, 1985).

La preservación *in vitro* se puede efectuar por dos vías:

- 1) corto-mediano plazo en el cual se limita el crecimiento de las plántulas *in vitro* mediante el uso de bajas temperaturas, inductores de estrés osmótico como son el manitol y la sacarosa (Lieselotte et al. 1982; Rubluo y Kartha, 1985) e inhibidores del crecimiento como el ácido abscísico (ABA), el ácido acetil salicílico (ASA), etc. (López, 1987 ; IBPGR, 1986) y bajas temperaturas (Rubluo et al 1985a; El-Gizawy et al. 1987)
- 2) la segunda vía es largo plazo, en ésta se utilizan temperaturas superbajas como lo es el nitrógeno (N₂) líquido (-196°), a la cual el germoplasma congelado puede conservarse por muchos años y su recuperación se puede realizar en el momento en que se requiera (Kartha, et al. 1980; Kartha. et al. 1979; IBPGR, 1986 a).

Sin embargo, esta área de investigación por ser nueva, re-

quiere aún de estudios que permitan el mejor conocimiento de los procesos bioquímicos, fisiológica y cambios morfológicos que se dan durante el proceso de almacenamiento *in vitro* de los recursos vegetales (Withers, 1980). Más aún el IBPGR en su reporte de 1986 (a), hizo énfasis en la realización de un programa multidisciplinario de trabajo si es deseado establecer un banco de germoplasma.

El desconocimiento de la genética del material vegetal, justifica el uso del almacenamiento de germoplasma *in vitro*.

En el Seminario realizado en Inglaterra, se ha recomendado, la realización de estudios en las áreas que a continuación se describen, como alternativas para poder desarrollar técnicas que faciliten la conservación de recursos genéticos vegetales:

- 1) Investigar las condiciones favorables para la conservación de semillas recalcitrantes (semillas de vida corta) pues estudios cuidadosos hechos en algunas especies, han demostrado que dándoles las condiciones adecuadas se puede observar que en realidad no son recalcitrantes y que existe la posibilidad de ser almacenados por métodos convencionales.
- 2) Investigar más sobre la técnicas *in vitro* para: a) el establecimiento y mantenimiento de meristemas y ápices para que se desarrollen a bajas tasas de crecimiento, b) el establecimiento y mantenimiento de tejidos genéticamente estables y así poder regenerar plantas no alteradas genéticamente y c) aunado a los dos puntos anterior-

res, lograr el almacenamiento prolongado por medio de temperaturas superbajas (crioconservación), (Williams y Withers, 1980).

Por otra parte, Simmonds recomendó que al realizar estos estudios se tomen en consideración los siguientes puntos:

- A) El almacenamiento de semillas de vida corta significa en muchos casos almacenar grandes volúmenes, por lo tanto es importante tomar en cuenta que se necesita mucha más espacio para el almacenamiento.
- B) Las técnicas *in vitro* deben facilitar el paso de la cuarentena que es el mayor de los obstáculos para la conservación genética y la explotación de los clones.
- C) La notoria inestabilidad genética en los cultivos de callos (células y tejidos) *in vitro* es particularmente debida a la poliploidía/aneuploidía, sin embargo, otros mecanismos genéticos aún permanecen virtualmente inexplorados, (Simmonds, 1980).

2.1.4 Banco de germoplasma *in vitro*.

El IBPGR realizó un reporte en 1986(a), en el cual hizo las siguientes recomendaciones a todos los investigadores y sectores que estén interesados en iniciar el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*. En este reporte citan las características más importantes que deberán de tomarse en cuenta para la iniciación y planeación de estrategias y para

la inversión de recursos *in vitro*. La metodología para integrar un banco de germoplasma *in vitro* requiere la participación coordinada de diversas áreas de investigación, es decir, es una investigación interdisciplinaria. También, pide establecer con claridad los objetivos para una planeación racional haciendo énfasis en los siguientes puntos:

- Conservación de genotipos particulares deseables para lograr un mejoramiento a necesidades en un corto plazo, teniendo en cuenta la estabilidad genética la cual posiblemente sea inasequible.
- Conservación de diversidad genética en especies cultivadas y sus parientes silvestres para un mejoramiento de acuerdo a las necesidades a largo plazo.

Además pide este comité realizar estudios sobre la estabilidad genética en los cultivos *in vitro* para no perder genes valiosos.

Por otro lado, también deben tomarse en cuenta los siguientes puntos para aplicar adecuadamente estas técnicas y evitar esfuerzos inútiles antes de establecer un banco de germoplasma *in vitro*:

- En las formas de reproducción sexual cuyas semillas puedan ser almacenadas, deberán ser conservadas en forma de semilla para aumentar la representación de diversidad útil.
- Establecer un banco de genes activo "piloto" para identificar problemas prácticos y clarificar el camino que

se debe seguir, y

- Dado que se da una selección inconsciente durante la propagación de genotipos particulares *in vitro*, es esencial realizar un monitoreo que ayudará a corregir y así reducir la estrecha gama de diversidad genética en almacenamiento cuando se trate de una característica específica que se desee conservar.

Ejemplos de bancos de germoplasma *in vitro* son, el CIP, Centro Internacional de la papa, el CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical.

2.2 *Allium sativum* L.

El ajo es usado como alimento o condimento en la mayoría de los países y crece en casi todas las regiones frías. El ajo es una especie apomictica obligada (todas las formas son estériles) y se propaga por "dientes". (Novák et al., 1986). Etoh ha encontrado recientemente un clon de ajo fértil. Según Koul, la única posibilidad para el mejoramiento genético del ajo es mediante la selección clonal (Koul et al., 1979).

2.2.1 Descripción botánica de *Allium sativum* L.

El género *Allium* es muy extenso, consta aproximadamente de 500 a 600 especies distribuidas en el Hemisferio Norte, muchas son nativas de Norteamérica. El número cromosómico básico del género *Allium* es $x = 8$. Poseen un fuerte olor característico, algunas son aprovechadas como ornamentales y otras como condi-

mento (Novák et al., 1986).

Son plantas escamosas, la mayoría con hojas sub-basales o radicales únicamente, las cuales al igual que el escapo, son fistulosas o huecas, con bulbos tunicados, flores pequeñas pocas o numerosas en umbelas terminales que emergen de caliptras escariosas que van de 1 a 3, foliosas, blancas, verdosas, amarillas, rosas o púrpuras, con 6 segmentos blanquecinos libres o connados en la base; estambres unidos a la base del perianto; pistilo con un ovario súpero de 3 cavidades, estilo delgado y entero o con un estigma trifido; el fruto es una pequeña cápsula loculada (Bailey, 1977).

Allium sativum L. Ajo. Bulbos con muchas partes o dientes todos encerrados en una envoltura o piel sedosa y suave, blanca o rosa; escapo de 2 pies de altura (61 cm), que rebasan el tamaño de las hojas: muchas hojas que surgen de la base o corona, lisas, de 1 pulgada (2.54 cm) o menos de ancho, largas (puntiagudas): espata con punta de 3-4 pulgadas de largo, umbelas pequeñas y densas con brácteas largas, escariosas; flores frecuentemente desplazadas por los bulbillos, generalmente estériles, rosáceas con cerca de 1/6 de pulgada de largo, rebasadas por los finos pedicelas, con segmentos iguales lanceolados agudos, anteras y estilo exsertos, ovario oblongo-ovado y emarginado en el ápice. (Bailey, 1977).

2.2.2 Clasificación.

Cronquist (1981) incluye a la especie *Allium sativum* L. dentro de la familia Liliaceae. A continuación se muestra la

clasificación que hace de *A. sativum* :

Clasificación de *Allium sativum* L.

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsidae
Subclase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<i>Allium</i>
Especie	<i>Allium sativum</i> L.

2.2.3 Historia, propiedades medicinales y nutritivas.

El ajo es originario de Asia, llegó al próximo oriente hace por lo menos 4 000 años, se ha cultivado desde remotísimos tiempos. Los antiguos egipcios hacían gran caudal de ellos no sólo como condimento, sino como alimento por sus virtudes medicinales. En el libro de los Números (Libro IV de Maisés) se lee: "nos acordamos mucho del pescado que comíamos en Egipto de balde, de las cohombros, de los melones y de los puerras y de las cebollas y de los ajos" (Font Quer, 1980).

El pueblo Babilonia utilizaba el ajo, porque lo consideraba milagrosa, entre los males tratados con él, estaban las infecciones respiratorias y de la piel, era usado contra plagas y epidemias.

El mismo Aristóteles citó: "Es una cura para la hidrofobia, tónica laxante, caliente pero mala para los ojos. En Egipto el rey Keops, gastó 166 toneladas de plata en ajo para los obreros que construían la gran pirámide y se cuenta que hicieron huelga al escasear las provisiones de ajo.

Los curanderos indostanos del siglo V, recomendaban el ajo

para mejorar la voz y el intelecto, los persas medievales lo utilizaban para la buena circulación de la sangre. Los chinos lo utilizaban como sedante.

Incluso los médicos de las dos guerras mundiales, obligados a improvisar remedios, llegaron a usar el zumo del ajo para evitar la septicemia y la gangrena (Hornedo, 1987).

El ajo contiene en todas sus partes pero sobre todo, en el bulbo, una sustancia sulfurada inodora llamada aliína, la cual se convierte en alicina por la acción de la aliínasa y posteriormente se convierte en disulfuro de alilo que le da el característico olor a ajos (Font Quer, 1980 Messiaen, 1974). Posee propiedades antibióticas para una gran gama de microorganismos, se ha comprobado que los ajos son capaces de eliminar ciertas especies patógenas de la flora intestinal sin dañar a otras inocuas.

Si el ajo se somete a cocción, la alicina es degradada en disulfuro y trisulfuro de alilo de los cuales el gusto es diferente y las propiedades antibióticas son más débiles. Sin embargo, estos compuestos conservan una interesante acción insecticida y vermífuga (Messiaen, 1974).

El ajo también ha gozado de prestigio por su capacidad de repeler el mal, se pensaba que actuaba mágicamente contra la oscuridad y todos los terribles presagios que pueden producirse tras la puesta del sol.

En pleno siglo XX, en algunos países se usa como amuleto, las trenzas de ajo se cuelgan en los comercios y en hogares, para así rehusar del mal. Incluso el ajo "macho", ha adquirido

elevados precios por quienes lo consideran su amuleto inseparable.

Actualmente se le atribuyen las siguientes propiedades: sana enfermedades y dolencias, como la picadura de serpientes, hemorroides, úlceras peptídicas, asma, convulsiones, sarampión, catarro común, fiebre, peste, el zumo de ajo puede reducir el nivel de azúcar y atacar el colesterol (Hornedo, 1987), también posee propiedades hipotensoras, el descenso de la presión sanguínea en los hipertensos y arterioescleróticos se logra sin complicaciones secundarias y con carácter no tan efímera como el de otros hipotensores (Font Quer, 1980). En Estados Unidos, el gobierno dona 300 tons. de este producto, para experimentar con el corazón del diente de ajo después de dos meses de cosechado, como auxiliar imprescindible en la cura del cáncer (Hornedo, 1987).

En la actualidad se ha comprobado que los ajos tienen cierto poder bactericida, mediante el cual son capaces de eliminar determinadas especies patógenas de la flora intestinal sin dañar a otras inocuas (Font Quer, 1980).

En cuanto a su valor nutritivo, contiene 7 % de proteínas, 0.2 % de grasas, 28 % de carbohidratos, 0.8 % de fibra, 1 % de cenizas 63 % de agua, es rico en potasio, fósforo y calcio, y tiene las vitaminas B y C (Purseglave, 1972; Hornedo, 1987).

2.2.4 Fisiología del desarrollo del ajo.

El ajo pasa por un cierto número de estados fisiológicos sucesivos, estrechamente ligados a las condiciones climáticas.

Messiaen (1974), reconoce cuatro estados fisiológicos:

- a) Latencia de los dientes y el tiempo medio en que se prolonga el rampimiento.
- b) Efectos del frío aplicados a los dientes en el desarrollo ulterior de las plantas.
- c) Condiciones óptimas de la cruz vegetativa.
- d) Condiciones climáticas que inducen el ensanchamiento de los bulbos.

A continuación se explican cada uno de estos puntos:

- a) Latencia de los dientes y el tiempo medio en que se prolonga el rampimiento.

Respecto a la latencia de los bulbos, estos al estar recién cosechados son incapaces de germinar. La salida de la latencia depende de la variedad y de la temperatura a la cual son conservados.

A los 7°C, la salida de la latencia es más rápida y es probable que durante esta salida disminuya el contenido de alicina de la escama de reserva del diente del ajo aprovechándose para la germinación.

Es posible prolongar la latencia por medios naturales o artificiales. Se ha encontrado que la temperatura ejerce una gran influencia sobre la latencia, se conocen dos condiciones muy diferentes con las que se consigue como máximo de almacenamiento un año:

- 1) 0°C (cuarta frío)
- 2) Arriba de 18°C.

Las temperaturas entre 0 y 5°C son necesarias para la diferenciación de yemas axilares, las cuales, producen los futu-

ros dientes.

- b) Efectos del frío aplicados a los dientes en el desarrollo ulterior de las plantas.

En un almacenamiento escalonado de dientes de ajo, antes de la siembra, se encontró que los dientes almacenados de 0° a 5°C reventaron antes de ser sembrados, los bulbos almacenados a 10°C se conservaron en muy buen estado, y los bulbos almacenados entre los 15 ° y 20°C, fueron bulbos poco llenos o vacíos.

De los resultados anteriores Messiaen (1974) indicó que el frío es importante para la diferenciación de yemas axilares productoras de bulbos. Para las variedades de México y Egipto esto también ocurre.

- c) Condiciones óptimas de crecimiento vegetativo.

El ajo necesita temperaturas nocturnas de 16°C para tener un crecimiento vegetativo vigoroso.

La talla de los bulbos recolectados parece ser proporcional al número y a la longitud de las hojas producidas por la planta.

- d) Condiciones climáticas que inducen el ensanchamiento de los bulbos.

El ensanchamiento de los brotes o yemas axilares en los dientes se produce cuando la temperatura media sobrepasa los 18°-20 °C y cuando la longitud del día sobrepasa un umbral que es diferente para cada variedad. Para las variedades de origen tropical (México, Egipto) los bulbos se hinchan cuando los días sobrepasan de 11:30 a 12:00 horas.

Es importante considerar la etapa fisiológica en la que se

encuentran los explantes que van a ser ensayados en el CTV, ya que se ha reportado que la respuesta depende de esto (Murashige, 1974).

Dado que no se contó con la información acerca del desarrollo de los ápices de ajo durante la latencia, en el presente trabajo se obtuvo una curva de crecimiento y determinamos tres etapas fisiológicas interesantes para los objetivos de nuestro estudio.

2.2.5 Importancia económica en México.

México es uno de los principales países que exporta ajos a los Estados Unidos en el mundo.

Tabla 1. Principales estados de la República Mexicana que exportan ajo a Estados Unidos.*
Temporada 1987-1988.

ESTADO	PRODUCTO (Kg neto)
Guanajuato	2 148 100
Aguascalientes	1 598 782
Baja California Norte	1 146 241
Zacatecas	386 757
Sonora	128 684
Baja California Sur	68 533
Nuevo León	61 000
Veracruz	45 164
Queretaro	41 582
Sinaloa	27 640
San Luis Potosí	21 750
México	20 476
Jalisco	10 727
Chihuahua	6 643
Tamaulipas	2 747
Morelas	298
TOTAL	5 654 287

Esta hortaliza se cultiva en varios estados de la República Mexicana, entre los cuales destacan: Guanajuato, Aguascalientes, Baja California Norte, Zacatecas, Sonora, Nuevo León, Queretaro, Sinaloa (Ver tabla 1).

En el periodo de 1986-1987 la producción de ajo fue de 6 739 206 kg neto, mientras que en el periodo de 1987-1988 la producción neta fue de 5 654 287 Kg, esto significa un decremento de -16.09 % (UNPH).

2.2.6 Enfermedades y plagas.

La pudrición blanca del ajo y la cebolla, la origina el hongo *Sclerotium cepivorum*, Berk. Este hongo tiene la apariencia de un algodón húmedo al cual se le observa comunmente en las raíces o en el cuello de las plantas. Posteriormente aparecen unas estructuras de resistencia llamadas esclerosios los cuales pueden permanecer muchos años en el suelo y germinan hasta encontrar de nuevo las condiciones proicias para ella; *Sclerotium cepivorum*, solamente vuelve a germinar en presencia de cultivos tales como el ajo y la cebolla (Laborde,1988).

Entre otras enfermedades importantes del ajo están "la mancha púrpura" causada por el hongo *Alternaria porri* y "botritis" causada por el hongo *Botrytis allii* rust (*Puccinia porri*) (*Penicillium*) (Novák et al. 1986).

Las principales plagas que atacan el ajo están los "trips" (*Trips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*, *Aethiomyza major*) "el minador de la hoja" (*Liriomyza sp.*) y el "nematodo de bul-

bas y tallos" (*Ditylenchus dispacii*).

El virus del mosaico del ajo, es también otra de las enfermedades frecuentes del ajo (Novák et al., 1986). Aunque se han encontrado diferentes grados de tolerancia en clones adaptados localmente, sin embargo, el mejoramiento tiene poca posibilidad de introducirse como material en este programa de mejoramiento, debido a que no puede llevarse a cabo la hibridación en las especies que se cultivan por vía vegetativa.

2.3 Propagación *in vitro* .

2.3.1 Generalidades de la propagación *in vitro* de bulbos.

Los bulbos son usados para cultivos de flores y también como fuente de farmacéuticos y condimento para alimentos. Los principales cultivares hortícolas son en su mayoría híbridos complejos, los cuales se originaron como únicas plantas seleccionadas. Su explotación y producción, por lo tanto, son dependientes de la eficiencia de la propagación vegetativa.

Los bulbos son susceptibles al debilitamiento por infecciones virales. Se propagan naturalmente por el desarrollo de yemas axilares dentro de las hojas o escamas, ya que sólo un pequeño número es producido anualmente, y las tasas de incremento son muy bajas para introducir nuevos cultivares o reservas libres de virus.

Actualmente existen métodos convencionales que aceleran la propagación e incluso pueden ser suplementados o reemplazados por métodos más rápidos y eficientes como son las técnicas de *in vitro* (Hussey, 1982).

En lo que se refiere a la propagación *in vitro* de monocotiledoneas, los explantes que se utilizan con más frecuencia son: meristemas axilares en forma de yemas, bulbillos los cuales pueden producir brotes axilares y brotes adventicios. También pueden ser inducidos de otros órganos como: la base de la hoja, escama, tallo (placa basal), inflorescencia y la flor: pedicelos, ovarios, polen, etc. (Hussey, 1982, Novák et al., 1986).

2.3.2 Eventos morfogénéticos *in vitro* en *Allium sativum* L.

Entre los principales eventos morfogénético *in vitro* se encuentran la formación de brotes adventicios, brotes axilares y la formación de tallos y embriones a partir de callo y la regeneración a partir de meristemas.

a) Multiplicación por brotes axilares.

Los bulbos, generalmente forman un tallo en la axila de cada hoja o escama. Las yemas axilares (o tallos adventicios de los explantes) cultivados en un medio con citocininas, crecen como plantulas ramificadas, las cuales pueden ser subdivididas y subcultivadas. En el género *Allium*, la dominancia apical es tan fuerte que muy pocas yemas axilares son formadas y este tipo de multiplicación no es del todo efectiva (Hussey, 1982). Sin embargo, los resultados obtenidos por Bhojwani (1980) mostraron la formación de plántulas a partir de yemas axilares utilizando 2iP en *Allium sativum* L.

b) Multiplicación por brotes adventicios.

El principal método de propagación para *Allium* es la inducción de brotes adventicios producidos directamente de explantes de órganos. Los bulbos surgen de los meristemas que se encuentran en la base de las hojas y escamas donde ellos se unen a la placa basal. Estas regiones meristemáticas regenerarán tallos en todos los generos. En los bulbos la base de las escamas (twin scales) formaran un tallo o tallos en un medio libre de hormonas. Con elevadas concentraciones de auxina responden el ajo y especies de otras géneros. Los explantes de escamas y base de la hoja forman tallos multiples en el medio con citocininas más auxinas. Bhojwani (1980) obtuvo brotes adventicios al combinar 2iP (0.5 mg/l) mas ANA (0.1 mg/l).

Yemas o bulbillos cultivados en medios conteniendo suficientes auxinas mas citocininas forman tallos adventicios alrededor del tejido basal hinchado. (Hussey, 1982). Bhojwani (1980) encontró que por lo menos el 50 % de los ápices probados, desarrollaron brotes adventicios en la región basal al incubarse en medio BS con 2iP y ANA. Respecto a los cambios genéticos se ha encontrado que en general los brotes adventicios y axilares son estables. En *A. cepa* L. especie muy cercana a *A. sativum* de 224 plantas estudiadas sólo 1 fue tetraploide (Bhojwani 1980).

c) Origen de tallos adventicios

Estudios histológicos han demostrado que en los generos *Allium*, *Narcissus* y *Nerine*, los tallos adventicios inducidos sobre escamas gemelas (twin) y base de las hojas, surgen de divisiones en la epidermis y de por lo menos una capa más inter-

na de células sobre la superficie abaxial cercana a la unión con la placa basal.

Observaciones posteriores sugieren que el modo multicelular para la formación de meristemas basales puede aplicarse a todos los bulbos y que la estabilidad genética de los tallos adventicios basales puede ser similar a la estabilidad de los tallos axilares (Hussey, 1982).

d) Cultivo de Meristemas.

Este método generalmente es usado para la erradicación de virus en la micropropagación de plantas, y también se ha usado para obtener clones sanos en monocotiledoneas. Consiste en el cultivo del domo del meristema y tejidos adyacentes más o menos diferenciados con uno o dos primordios foliares.

Una de las principales características del cultivo de meristemas es que mantiene una alta estabilidad genética y consecuentemente los meristemas pueden ser usados para la conservación de germoplasma *in vitro*.

El meristema de cualquier especie del género *Allium*, está situado al centro del amplio tallo en su superficie superior.

Entre los autores que han trabajado con meristemas están Havráněk (1972), quien logró obtener un 87 % estuvo libre de virus, Novák (1983) al aplicar colchicina obtuvo plantas tetraploides.

Kehr (1976), Nome et al. (1981) han trabajado el cultivo de meristemas de ajo con buenos resultados. Nome et al. (1981), obtuvo un porcentaje de 23 a 34.6% de plantas producidas a partir de meristemas con un porcentaje de 87% de plantas li-

bres de virus.

e) Regeneración de tallos o embriones a partir de callo.

La facilidad con la cual los tallos pueden ser obtenidas directamente de los tejidos del bulbo o cormos, hacen poco atractivo el uso de callo, y menos aún por el riesgo de generar propágulos anormales. Sin embargo, por ser éste una posible fuente de variación deseable, mencionaremos que para la producción de callo se requiere de altas concentraciones de 2,4-D combinadas con una citocinina (Hussey, 1982), Novák (1981) y Novak et al. (1986), han señalado que bajo tales condiciones se produce alta inestabilidad genética.

Havránek y Novák (citado por Novák, 1981) fueron las primeras en establecer el cultivo de callo en ajo. Los callos fueron inducidos a partir de hojas jóvenes en medio MS suplementada con KIN (46.5 μ M), AIA (11.4 μ M) y 2, 4-D (4.5 μ M) sin luz obteniendo brotes y plántulas. En lo que se refiere a la formación de embriones somáticos a partir de callo, aún es vaga la respuesta (Novák et al., 1986).

2.3.3 Importancia de la propagación *in vitro* de *Allium sativum* L.

La importancia de las técnicas *in vitro* en la conservación de recursos genéticos vegetales ha sido reconocido por el IBPGR (citado por Yeaman, 1986). Las técnicas de *in vitro*, han probado ser herramientas útiles no convencionales para el mejoramiento del ajo y en especial para el género *Allium* (Novák, 1974; Novak, 1983; Phillips y Hubstenberger; 1987; IBPGR, 1986 b). Las variaciones cromosómicas y fenotípicas en

las plantas regeneradas, producen genotipos interesantes que pueden ser seleccionados. Por otro lado, el uso del cultivo de meristemas permite la erradicación de patógenos la cual redundará en la obtención de material sano de gran valor agronómico (Murashige, 1974). Más aún, tanto el meristemas como el cultivo de fragmentos de órganos de ajo nos proporcionan un sistema para una rápida propagación de plantas, los cuales también pueden ser usados para la producción de mutantes sólidos (El-Gizawy et al. 1987; Novák et al., 1986).

Es importante resaltar que la mutagenesis y la selección a nivel celular como problemas urgentes a estudiar, pues la obtención de flores fértiles y la resistencia a enfermedades son las características más importantes para el mejoramiento de esta especie (Novak et al., 1986).

Quák y Havránek (citado por Bohjwani (1980) reportaron una reducción en la producción mundial de ajo que va de un 3 a un 45 % por la presencia de virus. IBPGR (1986 b), recomendó el uso de las técnicas *in vitro* para el género *Allium* (con especial referencia al ajo), con el fin de aumentar el "pool" genético de estas especies que tienden a ser estériles (IBPGR, 1986 b).

2.3.4 Estabilidad genética en cultivos de *Allium sativum* L. *in vitro*.

El establecimiento de una colección de germoplasma *in vitro* requiere de una estabilidad genética, por esto, es necesario tener un conocimiento amplio de este aspecto.

El género *Allium*, pertenece a las especies polisomáticas

caracterizadas por endopoliploidización en el transcurso de la diferenciación celular. Por lo anterior, debe tenerse en mente al iniciar un cultivo, que el tejido puede contener células poliploides, las cuales pueden, por lo menos teóricamente, participar del desarrollo de una población cariológicamente heterogénea (Novak, 1981; Novak et al. 1986).

En estudios citogenéticos hechos en cultivos de callos de *Allium sativum* L. se encontró que en segmentos de la base de la hoja de *A. sativum* ($2n = 16$) existen no solamente células diploides, sino también algunas endopoliploides con un contenido de ADN nuclear superior a 8 C.

La inducción de callos derivados de segmentos de la base de las hojas expuestas a 2, 4-D produjo una intensiva poliploidización (70%) después de 30 días de exposición.

Los cultivos de callo establecidos por largo tiempo alcanzaron una estabilidad en la heterogeneidad, esto dependió del genotipo, del explante inicial y de la composición hormonal del medio (Novak, 1981; Novak et al. 1986). Entre los cariotipos encontrados están las poliploidías, aneuploidías, con un número cromosómico de hipohaploidía hasta hiperoctoploidía.

Las células tetraploides prevalecen en un 48% en algunas líneas. También se registraron cambios estructurales en los cromosomas de células diploides y tetraploides.

Cuando se subcultivaron los callos a un medio de regeneración, ocurrió una selección gradual de las células de bajo nivel de ploidía.

Además, las plantas obtenidas de los callos mostraron una

variación en ciertas características fenotípicas comparándolas con la progenie de los "dientes", difiriendo entre otros aspectos en: altura de la planta, número de hojas, posición de éstas, peso y forma de los bulbos, número de hojas dentro del bulbo y color de la escama del bulbo (Novák et al., 1986).

El origen de la variación somaclonal en cultivos de tejidos de *Allium*, todavía no es muy clara y la posibilidad de controlarla es muy limitada. Sin embargo, los resultados mencionados arriba demuestran que la variación somaclonal puede jugar un papel importante en el mejoramiento de especies cultivadas del género *Allium* (Novák et al. 1986).

2.4 Reducción del crecimiento por inductores de estrés osmótico y por bajas temperaturas.

El primer requisito de cualquier método para almacenamiento de material genético, es modificar la cinética del crecimiento del cultivo. Existen diferentes medios para lograr esto como es la depresión del metabolismo al adoptar una temperatura de incubación no óptima o por medios químicos como inductores de estrés osmótico (manitol, sorbitol y sacarosa), ácido abscísico, CCC e inclusive el ácido giberélico (GA₃) (Staritsky, 1980; Yeoman, 1986).

En general, un estresante puede entenderse como cualquier factor ambiental capaz de producir en la planta un daño químico o causar un cambio físico, el cual, puede ser reversible o permanente (Tal, 1983). Un estresante osmótico, es capaz de incrementar el potencial osmótico de las células (lo hace más

negativo) dando un potencial de presión (ψ_p) negativo.

En muchas frutas carnosas el potencial osmótico del jugo de la fruta es tan negativo que evita la germinación de sus semillas en las plantas (Salisbury and Ross, 1978).

Las sales, la sequia, altas y bajas temperaturas, toxicidad mineral y deficiencia mineral con frecuencia son citados como "estresadores ambientales", que limitan las altas producciones (Tal, 1983).

Existen también compuestos químicos, osmóticamente activos. Entre ellos se encuentran: el manitol, el sorbitol, la sacarosa y la prolina entre otros (Salisbury and Ross, 1978).

2.4.1 Retardo de crecimiento por efecto de sacarosa y manitol en cultivos *in vitro*.

SACAROSA. Este azúcar es usado en cultivos de células y tejidos vegetales como fuente de carbono ya que estos generalmente no realizan la fotosíntesis *in vitro*, por esto es esencial para el cultivo de células vegetales (Gamborg et al., 1976; Husemann y Barz, 1977).

La mayoría de los medios de cultivo vegetales utilizan la sacarosa en un 3 %, ya que a concentraciones mayores, 4-14 %, producen estrés osmótico en las células dando como resultado una inhibición en el crecimiento celular (Sakuta y Komamine, 1987). Kimball (citado por Sakuta y Komamine, 1987) demostró que el tamaño celular disminuye al aumentar la sacarosa en cultivos de soya. En cultivos en suspensión de *Phytolacca americana* se encontró que la sacarosa por sí misma produce un aumento celular, pero al aumentar la concentración de esta, el

tamaño de las células disminuyó debido al aumento de la presión osmótica.

MANITOL. El amplio uso del manitol como osmorregulador está basado en asumir que: 1) el manitol no penetra a las células vegetales y que si entra, este no es metabolizado por las células (Evans y Cocking, 1973; Salisbury y Ross, 1978), en cambio otros (Trip et al., 1964) reportan que algunas especies vegetales sí son capaces de metabolizarlo.

En bacterias ya se ha descrito el metabolismo del manitol por varios autores (Bidwell, Craigue y Krotkov, 1955; Bidwell y Ghosh, 1962; Liss, Horwitz y Kaplan, 1962; Mair and Markus, 1962, citados por Trip et al., 1964). En las bacterias el manitol es transformado a fructosa por fosforilación.

Trip (1964), al estudiar el transporte de fructosa, glucosa y manitol en 26 especies pertenecientes a 17 familias, encontró que las altas concentraciones de manitol producen una disminución en el volumen celular. En sus experimentos realizados por él, encontró lo siguiente:

- a) El manitol, sí penetra a las células y es usado como sustrato respiratorio por 15 de las especies estudiadas.
- b) El manitol penetra rápidamente a los haces vasculares.
- c) Penetra lentamente a los sitios de rompimiento (mesófilo).
- d) Al usar manitol marcada con C^{14} y medir la curva de incremento de $C^{14}O_2$ se encontró que las curvas obtenidas con fructosa y glucosa son parecidas a la curva del manitol
- e) La lentitud de la entrada del manitol a los sitios de rompimiento pudieron deberse a la baja inducción de una en-

zima o a la baja penetración al sitio del metabolismo.

Entre otros de los efectos del manitol, diversos autores han observado que también ayuda a aumentar la tolerancia al congelamiento. Withers y Street (1977) demostraron que cuando se sometieron las células de *Acer pseudoplatanus* a un medio de cultivo adicionado con manitol a niveles superiores al 3.3 %, aumentó la tolerancia a bajas temperaturas. En estudios posteriores Withers y King (citada por Yeoman, 1984), no encontraron daños al usar 6% de manitol.

Pritchard et al., (1982), encontró en *Acer pseudoplatanus* tratados con manitol, un incremento del 50 % de células pequeñas, las cuales tuvieron en su interior vacuolas más pequeñas que las encontradas en las células mantenidas en un medio sin manitol.

El efecto del manitol no queda reducido sólo a un encogimiento del volumen, ya que Pritchard et al. (1982) al parecer, el pre-cultivo en manitol dio como resultado cambios morfológicos y fisiológicos en las células, al mismo tiempo que les va dando resistencia al frío. Withers y Kartha (citada por Yeoman, 1984) notaron que las células más tolerantes al congelamiento de *Catharantus roseus* tendían a ser multivacuoladas. Pritchard observó además los siguientes cambios en las células en precultivo con manitol:

- 1) depresión de la respiración y crecimiento, 2) una reducción en el contenido de agua intracelular con aumento de solutos citocitoplásmicos, incluyendo proteínas solubles y 3) cambios en el grosor de la pared celular y en su comportamiento bajo

condiciones plasmolisantes.

En general se ha encontrado que las concentraciones de 0.45 a 0.8 M de manitol han resultado adecuadas para el aislamiento de protoplastos de mesófila (Evans y Cocking, 1973).

2.4.2 Retardo de crecimiento por efecto de bajas temperaturas en cultivos *in vitro*.

El medio usual enriquecido, combinado con inductores de estrés osmótico o inhibidores químicos, son recomendados para el almacenamiento de cultivos (Staritsky, 1980), sin embargo, Yeoman (1986) indicó que resulta difícil suprimir la división celular a través del uso de inhibidores o medios mínimos sin causar la muerte a las células, por esto, recomienda el uso de bajas temperaturas, siendo el camino más satisfactorio para suprimir la división celular y la síntesis de DNA con el propósito de obtener estabilidad genética a largo plazo en cultivos *in vitro*.

El primer reporte relevante acerca del uso de la limitación del crecimiento fue el de Galzy (citada por Yeoman, 1986) quien almacenó brotes de *Vitis rupestris* por diez meses a una temperatura de 9°C. A partir de 1973, se han producido muchos trabajos en los que utilizan bajas temperaturas para retardar la formación de brotes en cultivos *in vitro*, especialmente para especies del género *Solanum* y cultivos de tubérculos y raíces (Staritsky, 1980; Bhojwani, 1981; Rodríguez-Garay y Barrow, 1986; Staritsky, 1986). Diversos cultivares de papa, han sido almacenados en temperaturas de 8 a 10°C *in vitro*, en el CIP en Perú. En el Centro Internacional de Agricultura

Tropical, en Colombia, se almacena principalmente la casava en temperaturas relativamente bajas de 20 a 22°C en medios mínimos. Staritsky (1980) enfatizó que la temperatura óptima para almacenamiento va a ser diferente para cada especie. En el INIA de Chile, almacenan los bulbos de ajo a una temperatura de 8 a 12°C por un periodo de 60 a 90 días antes de iniciar el cultivo *in vitro*.

Aunque los daños por frío son observados primeramente en las plantas de clima tropical o subtropical, ciertas células de plantas de clima templado también pueden ser dañadas. Por ejemplo, una temperatura de 0 a 3°C producen esterilidad en el trigo cuando el polen está en el estado de la primera división nuclear. Es difícil definir cuantitativamente el estrés por bajas temperaturas ya que además, la resistencia a estas temperaturas en la mayoría de los casos es interpretada como tolerancia (capacidad de prevenir, disminuir o reparar la tensión productora del daño inducida por el estrés). Los dos tipos de daño por estrés que pueden ocurrir por bajas temperaturas son:

1) directo- Sieble (citado por Levitt (1980) dividió en dos grupos a las plantas que sufren este daño por la velocidad de la reacción:

- cuando en cuestión de horas o hasta un día una planta muestra daños como por ejemplo manchas debida a la muerte del protoplasma y a la infiltración de los espacios intra-celulares, y
- cuando el daño se produce entre los 5 y 6 días, el

tejido se vuelve suave, esto puede deberse a un aumento en la permeabilidad del plasmalema produciéndose una pérdida de agua, es probable que no exista daño en la membrana (levitt, 1980).

2) Indirecto- Este tipo de daño es más común que el anterior, se requiere de días o semanas para que se produzca. Las células de las plantas de este grupo que fueron expuestas a bajas temperaturas, mostraron un cambio en la permeabilidad de la membrana debido a un cambio en el punto de fusión de los lípidos o bien por un cambio químico (peroxidación).

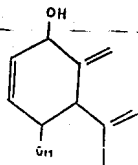
El estrés por congelamiento sólo ocurre cuando la temperatura externa está abajo del punto de congelamiento del agua y puede ser definido como el potencial de congelamiento del estrés por bajas temperaturas.

2.5 Piqueral A.

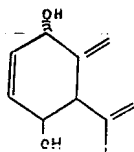
2.5.1 Estructura y propiedades químicas del piqueral A.

Piqueral A y B son dos terpenos diastereoisómeros. La estructura cristalina de piqueral A fue determinada por rayos X (Soriano-García, 1983). En estado cristalino esta molécula se estabiliza por los enlaces de puente de hidrógeno intermoleculares. Su peso molecular es de 141.1151 gr, el punto de fusión es de 137°C (comunicación personal con el Dr. Jiménez), presenta mediana solubilidad en agua (1mg/1ml).

Las estructuras químicas del piqueral A y B son las siguientes:



Piqueral A



Piqueral B

(González, et al.1981).

2.5.2 *Piqueria trinervia* Cav.

Esta planta pertenece a la familia Compositae, de la tribu Eupatorieae, es un arbusto herbáceo perenne, con una altura aproximada de 1 m, es altamente ramificado con pocas hojas opuestas, estrechamente lanceoladas y acuminadas, con tres nervios fuertemente marcados que es lo que caracteriza a la especie *trinervia*. La inflorescencia es cimosa corimbosa. Las cabezas tienen cuatro flores blancas.

Se encuentra ampliamente distribuida en diversos estados de la República Mexicana por lo cual es conocida popularmente con diversos sinónimos (Paray, 1953; Campos, 1989):

Cuimic (tarasco, Michoacan)

Xoxanitsal y Xoxanitztac (Mesa Central)

Tzatzoniztale (Morelos)

Alta Reina (Taxco, Guerrero)

Empueshte (otomí, México)

Caupopolchi (Teloloapan, Guerrero)

Xexenitzal

Hierba del tabardillo

Hierba del perro (Chiapas)

Hierba del zopilote (Molango, Hidalgo)

Hierba de San Nicolás (Valle de México y Jalisco)

Es nativa de México, América Central y Haití. Ha sido cultivada como planta ornamental y los horticultores la conocen con el nombre erróneo de *Stevia serrata*.

Crece en zonas templadas y tropicales de México, se le encuentra preferentemente en lugares abiertos y soleados, raramente se localiza en los bosques sombreados. En el Valle de México se encuentra a una altura de 2 500 m de altitud.

Florece abundantemente en los meses lluviosos de julio a octubre. Frecuentemente se encuentra esta especie como pionera de la sucesión secundaria que sigue al abandono de los campos agrícolas (González et al., 1981).

Antiguamente esta planta fue motivo de estudio en los que se aislaron grasas, ácido tánico, una resina y material gomoso entre otras compuestas (Romo et al., 1970). Pero no fue sino hasta 1968 cuando Bohlmann y Zdera aislaron (-)- α - Santalal, un terpenoide de bajo peso molecular (citado por Campos, 1989; en 1970, Romo et al., aislaron entre otras sustancias, acetato de carquejila y dos monoterpenos diastereoisómeros, llamados piqueral A y piqueral B, obtenidos cada uno de ellos de poblaciones diferentes. En 1983, Soriano-García et al., (1983) confirmaron la estructura del piqueral A por un estudio de difracción de rayos X. De 5 Kg de plantas secas de *Piqueria*

trinervia, se obtienen 400 mg de piqueral A.

2.5.3 Propiedades medicinales del piqueral A

Paray (1953) reportó que *P. trinervia* es usada en la medicina popular. Tiene propiedades antipiréticas, antimalarias, antirreumáticas, también es usada para combatir tifo y la infusión alcohólica en fricciones para reumatismo.

2.5.4 Potencial alelopático.

Piqueria trinervia tiende a crecer formando agregaciones extensas, más o menos puras, que pueden sugerir la posibilidad de tener una acción de alelopatía al evitar el crecimiento de otras especies alrededor de ella.

Romo et al. (1970) aisló entre otras sustancias, dos terpenos diastereoisómeros. Uno de ellos, piqueral A, que fue obtenido de poblaciones de *Piqueria trinervia* del Pedregal de San Angel, ciudad de México, y el otro, piqueral B, de poblaciones de Atlacomulco, Estado de México.

González et al. (1981), reportaron que piqueral A inhibe la germinación de semillas de especies que se desarrollan en las zonas donde *P. trinervia* crece, algunas de estas especies son: *Bromus carinatus* Hook. et Arn., *Bidens odorata* Cav., *Bidens serrulata* (Poir.) Desf., *Lopezia racemosa* Cav., *Lepidium virginicum* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Mimosa pudica* L., *Mimosa somnians* H. et B. y *Brassica campestris* L. "nabo" de la variedad "snow ball", el porcentaje de inhibición fue muy alto, del 50 al 100% por lo que se demostró su potencial ale-

lopático. Las concentraciones de piqueral A que se utilizaron fueron de 50, 100, 150 y 200 mg/l.

Piqueral A, fue mas activo en la inhibición del crecimiento de raíces, mientras que piqueral B tuvo un efecto inhibitorio en el tallo, pero en las raíces fue nulo el efecto o incluso estimuló el desarrollo a muy bajas concentraciones. El extracto de la hoja causó una fuerte inhibición en las radículas de las semillas probadas en un 50 a 95 % (González et al., 1981).

3. OBJETIVOS.

El objetivo general del presente trabajo fue retardar el crecimiento de ápices de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Taiwan, *in vitro*, por medio de la aplicación de distintas concentraciones de sacarosa y manitol (inductores de estrés osmótico) o con piqueral A, a baja temperatura (4°C) y modificaciones del fotoperíodo. El material biológico de estudio, fue ensayado en tres distintos estados fisiológicos.

Los objetivos particulares fueron:

1. Determinar la actividad osmótica de la sacarosa y el manitol a diferentes concentraciones (3, 5, 7, 9 y 11 %) y (0, 3, 5, 7 y 9 %) respectivamente sobre ápices de ajo en fases fisiológicas críticas de germinación (A₁ y A₂).
2. Probar la combinación de agentes osmóticos (3 % de sacarosa más 0, 3, 5, y 7 % de manitol) a la temperatura de 4°C, en fase fisiológica A₀.
3. Conocer el efecto del piqueral A, con diferentes concentraciones (0, 5, 10, 15, 20 y 30 mg/l) en el desarrollo de ápices de ajo en la fase fisiológica A₂ y probar su posible efecto como retardador de crecimiento.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material biológico.

Se usaron cabezas de ajos del cultivar "Taiwan" provenientes del INIFAP de Celaya, Gto. Estos ajos fueron cosechados en el mes de abril. Cada cabeza de ajos se dividió en dientes y de esta manera se mantuvieron a temperatura ambiente durante su periodo de latencia.

Los explantes utilizados fueron ápices con placa basal para las pruebas de retardadores de crecimiento.

Los ápices con placa basal tuvieron diferentes tamaños ya que en forma natural conforme va terminando el periodo de latencia (entre septiembre y octubre, su tamaño aumenta).

4.2 Desinfección y aislamiento de ápices.

Las cabezas de ajo se dividieron en dientes y cada uno de ellos se dividió a la mitad, de forma transversal al eje de crecimiento. La parte superior se desechó y la inferior fue la que se utilizó. Se le quitaron las cubiertas superficiales y lo más posible de escama de reserva, se lavaron con agua corriente, se desinfectaron superficialmente con alcohol al 70% durante 2 minutos y se esterilizaron con hipoclorito de sodio (blanqueador comercial) al 25% v/v (1.5% de cloro activo).

Se dejaron agitando durante 15 minutos y, posteriormente, dentro del área aseptica de la campana de flujo laminar se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada esterilizada.

El apice de cualquier especie del genero *Allium*, está si-

tuado al centro del amplio tallo en su superficie superior. El ápice del tallo se encuentra adentro y al fondo de la hoja tubular más joven. Una parte del amplio tallo (refiriéndose al verdadero tallo como placa basal o discobasal por diferentes autores). El meristemo siempre es sacado con un primordio foliar por lo menos.

Una vez que se localizó el ápice con la ayuda del microscopio estereoscópico, se le quitó el resto de la placa basal que lo rodeaba sin quitarle ninguna de sus hojas. Esto se hizo así porque se observó que la primera hoja sirve para dar apoyo a las hojas jóvenes, al momento de emerger, si esta hoja estaba ausente, las hojas jóvenes crecían torcidas y en forma desordenada observándose debiles. Cuando los ápices crecieron y tuvieron una talla de alrededor de 1.5 cm, ya no fué necesario usar el microscopio estereoscópico.

Una vez obtenido el ápice, con las pinzas se colocó en un tubo de ensayo y con una espátula larga la placa basal se sumergió someramente y en forma cuidadosa en el medio de cultivo (fig. 1).

4.3 Siembra

FASE I. Tratamiento.

Dado que el medio de cultivo contiene nutrientes que favorecen el desarrollo de microorganismos y éstos afectan a la respuesta de los explantes, se trabajó en un área aseptica, (campana de flujo laminar)

La disección de los explantes se realizó con la ayuda del

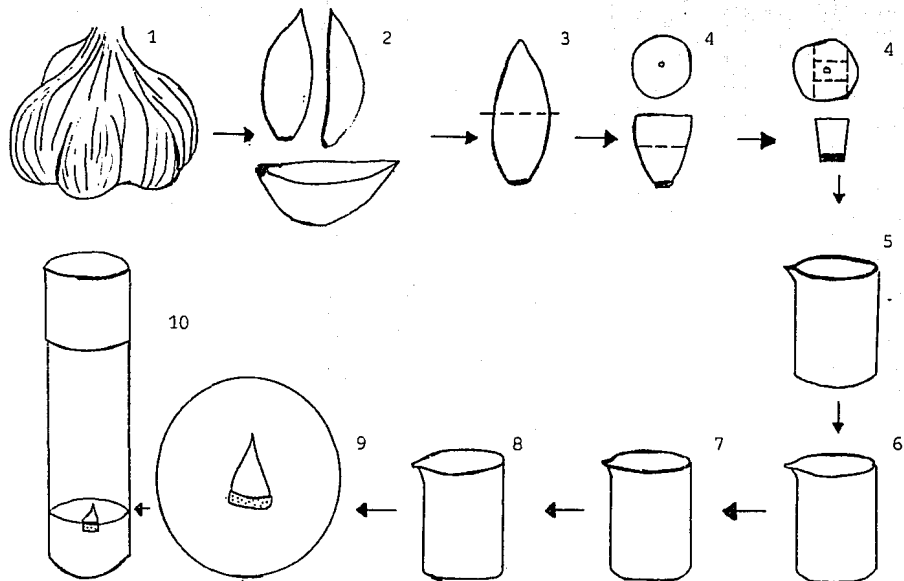


Fig. 1. Metodología para la desinfección superficial y siembra de ápices de *Allium sativum* L. 1. cabeza de ajo 2. separación de dientes 3. división por la mitad 4. limpieza y separación de las escamas de reserva 5. lavado con agua corriente 6. lavado con etanol al 70 % (v/v) por un minuto 7. lavado con NaOCl al 33% (v/v) por diez minutos 8. enjuague con agua destilada esterilizada 9. disección del ápice con ayuda del microscopio 10. siembra del ápice en el medio de cultivo

microscopio esteroscópico, pinzas, aguja de disección, bisturí todo el instrumental se sumergió en etanol al 96%, antes de su utilización, se flameó y se enfrió en agua destilada esterilizada, solo el bisturí no se flameó, sino que solamente se enjuagó en el agua destilada esterilizada.

Una vez aislado el ápice como ya se indicó, se colocó un ápice por cada tubo de ensayo. Cada bloque tuvo de 10 a 15 ápices. Ver tabla 3.

FASE II. Recuperación.

Las plántulas se subcultivaron a medio fresco. Se les quitó cuidadosamente el agar de sus raíces con una espátula, posteriormente se introdujeron las raíces en el medio de cultivo.

4.4 Condiciones de incubación.

Se utilizaron 2 condiciones de incubación:

- 1) $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 hrs. y 2 000 luxes de intensidad
- 2) 4°C , oscuridad.

Para lograr esta segunda condición se colocaron los tubos de ensayo en frascos cubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz y se mantuvieron en un refrigerador, cuya temperatura se había calibrado previamente en 4°C .

4.5 Medio de cultivo.

a) Para retardo de crecimiento. El medio de cultivo utilizada fue el MS (Murashige-Skoog, 1962) a la mitad de la con-

centración de sales (ver apéndice I), con diferentes concentraciones de sacarosa (3,5,7,9,11%) y manitol (3,5,7,9%) y 0.7 % de agar. Se ajustó el pH a 5.7-5.8. El medio de cultivo se esterilizó en un autoclave a 20 lb/pulg² de presión y 126°C durante 15 minutos. En tubos de ensayo de 25x150 mm se agregaron 15 ml del medio de cultivo. La tabla 3 muestra las combinaciones y las concentraciones de sacarosa y manitol, la tabla 4 muestra las osmolaridades que presentaron. Las osmolaridades fueron medidas en un osmómetro de presión de vapor marca Wescor modelo 5 500 cuya lectura tiene va de un rango de 0 a 1 999 mmol/kg. La tabla 5 muestra las concentraciones de piquero A probadas.

b) Para la recuperación de ápices. También se utilizó el medio MS a la mitad de la concentración de sales, con 3% de sacarosa esterilizada en autoclave a las condiciones señaladas anteriormente.

TABLA 3. Combinaciones y proporciones de manitol y sacarosa aplicados al cultivo de ápices de ajo.

No. de Tratamiento	Sacarosa (%)	Manitol (%)
* 1	3	0
2	3	3
3	3	5
4	3	7
5	5	0
6	5	3
7	5	5
8	5	7
9	7	0
10	9	0
11	3	9
12	5	9
13	11	0

* Testigo

TABLA 4. Concentraciones de piqueral A aplicados al cultivo de ápices de ajo.

No. de tratamiento	Piqueral A (mg/l)
* 1	0.0
2	5.0
3	10.0
4	15.0
5	20.0
6	30.0

* Testigo

TABLA 5. Osmolaridad de las soluciones utilizadas en este trabajo: medio MS a la mitad de la concentración de sales adicionado con manitol y sacarosa a diferentes concentraciones.

No. de tratam.	Composición 1/2 MS +... Sac Man		Osmolaridad (m mol/Kg)
1 *	3	0	198.00
2	3	3	381.00
3	3	5	508.00
4	3	7	637.00
5	5	0	294.66
6	5	3	465.66
7	5	5	627.33
8	5	7	754.00
9	7	0	401.00
10	9	0	505.00
11	3	9	775.00
12	5	9	908.00
13	11	0	638.00
14	-	-	102.00

* Testigo

4.4 Evaluación del desarrollo.

La respuesta de los ápices de ajo durante la fase de tratamiento es diferente de la respuesta en la fase de recuperación, por ésto, se describen a continuación los criterios considerados para la evaluación su crecimiento.

Fase de tratamiento (Fase I). Las características consideradas para esta fase fueron: incremento de la longitud de las hojas, el número de hojas formadas y el número de raíces formadas al finalizar el de tiempo establecido para cada experimento (ver tabla 1). Con respecto al incremento de la longitud de las hojas esta se obtuvo de la siguiente manera: al finalizar el tiempo de tratamiento se midió la longitud de la hoja más larga que haya tenido la plántula incluyendo la placa basal y a esta medida se le restó la longitud del ápice con la placa basal que tuvo al inicio del tratamiento.

En cuanto al número de hojas y de raíces, se contaron únicamente aquellas que fueron visibles.

Fase de recuperación (Fase II). Las características consideradas para esta fase fueron: la longitud de las hojas nuevas, el número de hojas nuevas y el número de raíces nuevas y el diámetro del bulbo en aquellas plantas que lo presentaron.

Respecto al incremento de la longitud de las hojas, de las hojas nuevas, se midió la longitud de la hoja más larga. Con respecto al número de hojas nuevas se tomaron en cuenta aquella que se formaron durante el periodo de recuperación, en el caso de las raíces, se tomaron en cuenta sólo las raíces formadas durante la fase de recuperación y aquellas que se

observaron en buen estado. En aquellas plantas que presentaron bulbo al finalizar la fase de recuperación se les midió el diámetro.

4.7 Planteamiento general de los experimentos.

Se realizaron cuatro experimentos con 10 a 15 repeticiones cada una distribuida en dos bloques completamente al azar. En el cuadro 2 se describen las condiciones de tratamiento y de recuperación para cada experimento.

TABLA 2. Descripción de los cuatro experimentos realizados.

	TRATAM.	CONDICIONES DE INCUBACION	FASE FISIOL.	TIEMPO DE TRATAMI.	TIEMPO DE RECUPERACION
1	SACAROSA	26°C, 2000 luxes fat 16 hrs.	A ₁ y A ₂	3 meses	2 meses
2	SACAROSA	26°C, 2000 luxes	A ₁	3	2
3	MANITOL	fat 16 hrs.		meses	meses
	SACAROSA	26°C, 2000 luxes	A ₂	3	2
	MANITOL	fat 16 hrs.		meses	meses
	SACAROSA	4°C	A ₀	13	15
	MANITOL	oscuridad		meses	días
	PIGUEROL	26°C, 2000 luxes	A ₂	1	15
	A	fat 16 hrs.		mes	días

1 CONTROL (sacarosa 9M)

2 y 3 VER TABLA 3.

Cada uno de los cuatro experimentos consistió de dos fases:

FASE I (Fase de tratamiento). En esta fase se probaron los efectos de las diferentes condiciones experimentales: sacarosa

y manitol, piqueral A, bajas temperaturas, fotoperiodo y oscuridad, durante el tiempo asignado previamente (ver cuadro 2).

FASE II (Fase de recuperación) consistió en subcultivar los ápices tratados (provenientes de la fase I) a un medio de cultivo fresco, libre de sacarosa, manitol, piqueral A, bajas temperaturas, fotoperiodo y oscuridad, es decir, desarrollados en las condiciones óptimas de crecimiento para los ápices previamente establecidas.

En vista de que los ajos no tienen un ciclo anual sin germinar (germoplasma recalcitrante), el material experimental trabajado durante abril-junio (material fresco) y de julio-octubre (material maduro) presenta diferencias fisiológicas fuertes. Al graficar la longitud de los ápices de ajo aislados del diente, desde los meses de abril a noviembre bajo condiciones ambientales, se obtuvo la siguiente curva de crecimiento (gráfica 1)

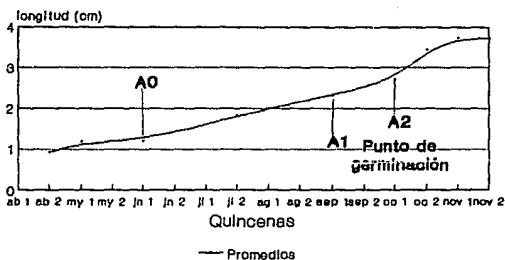
Se realizó una siembra de ápices de ajo en el mes de junio (material fresco), los cuales tuvieron un tamaño promedio de 1.2 cm. (A₀).

Se eligieron también las fases críticas del periodo de germinación, para evaluar diferentes estrategias experimentales. Así, un periodo de tiempo también probado fueron los ápices de la primera quincena de septiembre (1 mes anterior al punto de germinación), ver gráfica 1, al cual denominamos A₁, en el que los ápices presentan un tamaño promedio de 2.3 cm.

Homer (1939), estableció la época de germinación de los ajos entre finales de septiembre y principios de octubre. En

México el cv Taiwan se siembra justamente en este periodo de tiempo (Ing. Heredia, comunicación personal), por lo que se eligieron los datos de la primera quincena de octubre (A2) como el punto de inicio de la germinación, el tamaño promedio de los ápices fué de 2.8 cm siendo el punto de inicio de la fase exponencial (gráfica 1).

**Gráfica 1. Crecim. ápices de ajo.
abril-noviembre**



Promedios de la longitud de los
ápices

En los meses de diciembre ya no fue posible disponer de material experimental pues la mayoría de los ápices ya presentaron ciertas malformaciones en las hojas debido a la falta de condiciones adecuadas para continuar su desarrollo, la capa de almacenamiento de los dientes se observó arrugada e inclusive, muchas de ellas mostraron la presencia de hongos con sus

esporas. Esto concuerda con las observaciones hechas por Messiaen (1974) quien indicó que los dientes de ajo al salir de la latencia disminuye su contenido de alicina la cual es aprovechada para la germinación y puesto que esta substancia es un antibiótico para una gran gama de microorganismos, es factible pensar que la formación de hongos se deba a la baja concentración de alicina en esta etapa de germinación.

El ajo después de octubre, generalmente dispara la germinación, haciendo imposible su almacenamiento.

4.8 Tratamiento estadístico y programas de computación.

Se utilizó el diseño de bloques al azar. Para el análisis de resultados se manejaron las siguientes pruebas:

- | | |
|-----------------------------|---|
| a) Media | e) Análisis de varianza |
| b) Desviación estándar | f) Prueba de Tukey |
| c) Error estándar | g) Análisis de varianza multifactorial. |
| d) Coeficiente de variación | |

La operatividad de estas, se realizó a través del programa statgraphics (STG)(versión 2.15) al 95 % de confianza.

Otros programas utilizados para la elaboración de este trabajo fueron:

Lotus - en el cual se capturaron los datos de los factores analizadas (longitud de hoja, número de hoja, número de raíces).

Harvard-graphics (HG)(versión 2.0)- con el cual se realizaron las gráficas.

Chi-writer (CW)- procesador de palabras con el que se elaboró el texto y al cual se importaron los archivos de STG y HG.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1) EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN A₁

Las placas basales de ápices de ajo cultivadas *in vitro* durante la fase A₁ (antes de la germinación), y expuestas a tratamientos de sacarosa y manitol, se analizaron a los tres meses los siguientes parámetros: longitud de las hojas, número de hojas y número de raíces.

Con respecto a la longitud de las hojas, se observó una caída en la misma (tabla 6). En estos resultados observamos que el efecto principal se debe aparentemente al manitol, ya que la sacarosa a las concentraciones probadas (3, 5, 7, 9 y 11 %) no ejerció efecto sobre este parámetro. Para dilucidar esta conclusión preliminar, se efectuó un análisis de varianza (tabla 4), el cual mostró un efecto altamente significativo (al 1%), por lo que se practicó una prueba de Tukey (tabla 6) la cual mostró que efectivamente aquellos tratamientos que sólo tuvieron sacarosa (1, 3, 5, 9 y 10) no mostraron diferencias significativas formando un grupo homogéneo. Además pudo observarse que existieron diferencias significativas en cuanto a la longitud de las hojas al 9 % de manitol contra 3 y 5 %, ya que con 9 % se obtuvieron las longitudes promedio más bajas (2.7 y 3.3 cm). Con 3 y 5 % de manitol (tratamientos 2, 3 y 6) se obtuvieron longitudes promedio del orden de 9.2 a 13.2 cm.

Al graficar los promedios de todos los tratamientos estos hechos fueron también aparentes (gráfica 2). De la tabla de análisis de varianza multifactorial (tabla 7) pudimos apreciar

que la sacarosa no ejerció el efecto en la longitud de las hojas (al 5 %), el manitol si ejerció un efecto en el crecimiento de las hojas (al 1%), y no se encontró interacción del manitol con la sacarosa (al 5 %).

Con respecto al número de hojas formadas, no se observó una relación directa entre la concentración de manitol o sacarosa y el número de hojas formadas (tabla 8). El análisis de varianza (tabla 8), mostró la existencia de un efecto altamente significativo (al 1 %). En base a estos resultados se realizó una prueba de Tukey (tabla 8), la cual mostró tres grupos homogéneos, las diferencias más claras fueron entre los tratamientos 1 y 3, con una formación de 5.5. hojas en promedio, y los tratamientos 12, 11 y 6 con un promedio de 5.3 a 3.8 hojas formadas. Los ápices expuestos a la concentración de 9% de manitol (tratamientos 11 y 12), mostraron un menor crecimiento con respecto al testigo (1). En la gráfica 3, podemos apreciar que no hubo una relación marcadamente directa entre la concentración de sacarosa y/o del manitol y el número de hojas formadas.

Lo anterior nos lleva a pensar que el manitol fue el compuesto que ejerció el efecto. Un análisis de varianza multifactorial (tabla 9), indicó que: 1) la sacarosa no ejerció efecto sobre la formación de las hojas (al 5 %); 2) el manitol tuvo un efecto altamente significativo (al 1 %) en la formación de las hojas y 3) en cuanto a la interacción de ambos compuestos combinados, no se encontró significativo (con un 5 %).

Con respecto al número de raíces formadas, no se observó una relación aparente entre esta variable con la concentración de manitol y sacarosa (tabla 10). Esto se evidenció con el análisis de varianza (tabla 10) que demostró que efectivamente las diferentes concentraciones de manitol y sacarosa no influyeron en la formación de las raíces de los ajos (al 5 %).

De lo expuesto anteriormente se pudo apreciar que el manitol afecta a la longitud de las hojas y al número de estas a diferencia de la sacarosa que no lo hace. Puesto que desconocemos si el manitol puede ser metabolizado o no por el ajo, sólo podemos suponer, de lo reportado por Trip et al. (1964) que probablemente penetró a los haces vasculares de los ápices, ejerciendo desde fuera de las células una presión osmótica. Esto nos lleva a pensar que esta presión provocó cambios fisiológicos como pueden ser la disminución del volumen celular y aumento de solutos citoplásmicos, depresión de la respiración, cambio de grosor de la pared celular y cambio en su comportamiento bajo condiciones plasmolizantes como lo señaló Pritchard et al. (1982). Esto es lo que daría como resultado una disminución en el metabolismo celular y un abatimiento en la división celular, con la consiguiente disminución de la longitud de las hojas y del número de hojas al ir en aumento la concentración de manitol.

En lo que se refiere a la sacarosa, ésta no tuvo un efecto significativo sobre el desarrollo de las hojas al ser probada; a las concentraciones de 3 a 11 %, esto es contrastante a lo reportado por Sakuta y Komamine, 1987, quienes encontraron una

inhibición celular y estrés osmótico en los cultivos vegetales al adicionarseles sacarosa a concentraciones del orden del 4 a 14 %. En este trabajo las concentraciones de sacarosa probadas fueron (5 a 11 %) no fueron lo suficientemente altas para producir una inhibición celular y una presión osmótica que dieran como resultado un retardo en el crecimiento de los ápices de ajo. Esto se pudo comprobar, al comparar las diferentes presiones osmóticas de sacarosa que fueron ensayadas (tabla 4) y que no lograron producir el mismo efecto que el manitol a presiones osmóticas equivalentes. Por otro lado, se vio que las diferentes concentraciones de manitol y sacarosa, no afectaron al desarrollo de las raíces. En el estado fisiológico A₁, no se encontró efecto de interacción, entre sacarosa y manitol, en los tres parámetros analizados (longitud de hojas, número de hojas y número de raíces).

5.2) EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN A₂

Al exponer las placas basales de ápices de ajo durante la fase A₂ (en el punto de germinación), en diversos tratamientos de sacarosa y manitol, se analizaron, a los tres meses diversos parámetros: longitud de las hojas, número de hojas y número de raíces.

Con respecto a la longitud de las hojas, se observó una caída en la misma (tabla 11). En estos resultados observamos que el efecto principal se debe aparentemente al manitol, ya

que la sacarosa a las concentraciones probadas (3, 5, 7, 9 y 11 %) no ejerció efecto sobre este parámetro, esto fue similar a lo encontrado en A₁. Esto, fue aparente en el análisis de Varianza (tabla 11), el cual mostró una diferencia altamente significativa entre los promedios de los diferentes tratamientos (al 1 %), al practicarse la prueba de Tukey (tabla 11) ésta mostró que efectivamente aquellos tratamientos que sólo tuvieron sacarosa (1, 3, 5, 9 y 10) no mostraron diferencias significativas formando un grupo homogéneo, con una longitud que fue de 18.2 a 24.1 cm teniendo el testigo una longitud promedio de 24.1 cm. Además pudo observarse que existieron diferencias significativas en cuanto a la longitud de las hojas al 9 % de manitol contra 3 y 5 %, ya que con 9 % se obtuvieron las longitudes promedio más bajas (6.2 cm). Con 3 y 5 % de manitol (tratamientos 2, 3, 6 y 7) se obtuvieron longitudes promedio del orden de 10.2 a 14.4 cm.

Al graficar los promedios de todos los tratamientos estos hechos fueron también aparentes (gráfica 4). De la tabla de análisis de varianza multifactorial (tabla 12) pudimos apreciar que: 1) se encontró que la sacarosa no ejerció efecto sobre la longitud de las hojas a las diferentes concentraciones (al 1 %); 2) respecto al manitol, este sí ejerció un efecto altamente significativo en el crecimiento de las hojas (al 1%) y 3) en cuanto a la interacción del manitol con la sacarosa combinadas, ésta no fue significativa (al 5 %).

Esto demostró la no existencia de interacción entre ambos compuestos y el efecto fue debido únicamente al manitol.

Con respecto al número de hojas formadas, se observó que no existió una relación directa entre la concentración de manitol o sacarosa y el número de hojas formadas (tabla 13). Puesto que con estos resultados no está claro el efecto por parte de los compuestos probados, se efectuó un análisis de variancia (tabla 13), el cual mostró la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos al 1 %).

En base a estos resultados se procedió a realizar una prueba de Tukey (tabla 13), en la cual pudimos apreciar que las diferencias más claras fueron entre los tratamientos 7, 1 y 3, con una formación de hojas que en promedio van de 5.3 a 5.6, y el resto de los tratamientos cuyo promedio va de 3.5 a 4.1 de hojas formadas y son significativamente más pequeños que el testigo.

En la gráfica 4, pudimos apreciar que no hubo una relación marcadamente directa entre la concentración de sacarosa y/o del manitol y el número de hojas formadas.

Sin embargo, lo anterior nos llevó a pensar que el manitol es el compuesto que ejerció cierto efecto, al realizar un análisis de variancia multifactorial (tabla 14) el cual nos indicó que: 1) la sacarosa no afectó a la formación de las hojas (al 5 %); 2) el manitol mostró un efecto altamente significativo (al 1%) y 3) sí se encontró interacción la cual fue significativa (al 5 %).

Con respecto al número de raíces formadas, no se observó una relación aparente entre el promedio de raíces con la concentración de manitol y/o sacarosa (tabla 15). El análisis de

varianza (tabla 15) mostró que si hubo diferencias significativas entre los tratamientos (al 5 %). Al efectuar una prueba de Tukey (tabla 15) para estos resultados no se encontró una relación entre las diferentes concentraciones de sacarosa y manitol con la formación de raíces, esto fue observado mejor en la gráfica 6, sin embargo al realizar un análisis de varianza multifactorial (tabla 16) encontramos interacción de la sacarosa con el manitol (al 5%).

Los resultados de la fase fisiológica A₂ fueron muy semejantes a los obtenidos en la fase A₁, sin embargo, a diferencia de ésta, la fase A₂, no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con 3, 5 y 7 % de manitol (tabla 11), pero las curvas fueron muy parecidas (gráficas 2 y 4).

En lo referente al número de las hojas formadas en A₂ la gráfica 5 es muy parecida a la gráfica 3 ya que ambas presentan una caída con 3 % de manitol mas 3 y 5 % de sacarosa, y posteriormente hay un incremento al estar presente el manitol al 5 % con 3 y 5 % de sacarosa.

Cabe hacer notar también que a diferencia de A₁, en A₂ se encontró interacción para el número de hojas y de raíces. Esto se discutirá más adelante.

5.3 RECUPERACION DE APICES EN A₁

Dado que en los tratamientos 1, 2, 5, 6, 9, 10 y 13 (tabla 4) las hojas alcanzaron tallas mayores a los 10 cm, no fue posible subcultivarlos a un medio adecuado de crecimiento ya que su altura excedió la de los tubos de ensayo. Esta es la

razón por la cual no pasaron a la fase de recuperación, y no aparecen en las siguientes tablas de resultados. Sólo se tomaron en cuenta los datos obtenidos del grupo testigo (1) y del tratamiento 5, ya que ambos carecieron de manitol en el medio de cultivo durante la fase de tratamiento (Fase I) y sirvieron como referencia para compararlos con los tratamientos que fueron sometidos a las condiciones adecuadas de crecimiento (Fase II) respecto a los parámetros de: la longitud de las hojas, número de hojas y número de raíces. Es por esta que en la tabla 14 se les asignó 0.000 en el porcentaje de sobrevivencia, sin embargo, hubo 100 % de sobrevivencia en ambos tratamientos (1 y 5) al al término de esta fase, cabe aquí mencionar que las plantas que estuvieron en concentraciones altas de sacarosa, a los tres meses presentaban hojas secas y no eran robustas en la mayoría de los casos.

En lo referente a la longitud de las hojas obtenidas a los dos meses de permanecer en condiciones favorables de crecimiento, se encontró 100 % de sobrevivencia en todos los tratamientos (tabla 17), exceptuando los tratamientos 1 y 5 ya explicados anteriormente. En la misma tabla se puede apreciar que aparentemente, las plantas sometidas a manitol en la fase I, alcanzaron una menor longitud de hojas nuevas. Al efectuar un análisis de varianza (tabla 17), este demostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Con el fin de conocer si el manitol es el causante de la diferencia entre ellos, se practicó una prueba de Tukey (tabla

17), ésta nos reveló dos grupos homogéneos: 1) el primero estuvo formado por los grupos testigo y del tratamiento 5, con las tallas más altas (20.9 y 22.79), siendo estos tratamientos de referencia, 2) el segundo grupo estuvo integrado por el resto de los tratamientos. Esto confirmó que el manitol indujo el bajo crecimiento de las hojas. Al graficar los promedios (gráfica 6) se encontró una curva, para el manitol, semejante a la obtenida en la gráfica 2 de la fase de tratamiento. Además, el hecho de que estos datos se hayan obtenido al finalizar los dos meses de su permanencia bajo condiciones adecuadas de crecimiento, nos llevaron a confirmar lo anterior, es decir que el manitol afectó a los ápices durante el tiempo de tratamiento.

Sin embargo, bajo el supuesto anterior se efectuó un análisis de varianza multifactorial (tabla 31), el cual mostró lo que: 1) la sacarosa aplicada durante la fase I, no influyó significativamente en la respuesta de las plantas (al 5%), 2) el efecto encontrado, se debió al manitol aplicado también durante la fase I con un nivel altamente significativo (al 1%) y 3) al estar presentes ambos compuestos no hubo interacción (al 5%). Por lo que deducimos que el manitol es el agente causante del bajo crecimiento de las hojas. Es posible que este compuesto haya permanecido en los haces vasculares y que se encuentre en el interior de los tejidos produciendo el mismo efecto de estrés osmótico encontrado en la fase I (Trip, et al. 1964). Esto podría ser cierto ya que se observó que las primeras hojas que surgieron tuvieron tallas menores a las

hojas que se desarrollaron posteriormente, además de que en ningún caso se encontró lo contrario.

Respecto al número de hojas formadas, se observó en la tabla 19 que al finalizar los dos meses de la fase II, hubo un bajo número de hojas formadas en los tratamientos que estuvieron expuestos al manitol aplicado durante la fase I. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (tabla 19) el cual confirmó la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos (al 1%). Al efectuar una prueba de Tukey (tabla 19), se encontró que los tratamientos promotores de la formación de un mayor número de hoja nuevas fueron el testigo y el tratamiento 5 (5.5 y 4.9 respectivamente) y el resto de los tratamientos que tuvieron manitol durante la fase I formaron menos, sin embargo, no existieron diferencias significativas entre estos tratamientos (3, 4, 7, 8, 11 y 12) con 0.61 a 1.3 hojas. Esto pudo notarse mejor en la gráfica 8.

Lo anterior nos llevó a pensar que el manitol ejerció un efecto sobre la respuesta de los ápices, aún sin estar presente en el medio de cultivo.

Al realizar un análisis de varianza multifactorial (tabla 20), se encontró que efectivamente, el manitol fue el único agente causante de la baja formación de hojas en la fase II (al 1%).

En lo referente a la formación de raíces aparentemente no se encontró relación entre la formación de raíces con las concentraciones de los agentes osmóticos (tabla 21). Sin

embargo, al realizar el análisis de varianza (tabla 21) se encontró que sí existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo que se realizó una prueba de Tukey (tabla 21) la cual demostró que 1 y 5 fueron significativamente diferentes a todos los tratamientos (al 1%). Estos resultados están representados en la gráfica 9, en la cual se observa una disminución en el número de raíces formadas.

Al realizar un análisis de varianza multifactorial (tabla 22) se encontró que: 1) la sacarosa tuvo influencia sobre la respuesta (al 5%), 2) el manitol fue el agente causante de la baja respuesta a la formación de raíces nuevas con un nivel altamente significativo (al 1%) y 3) también se dio una interacción al estar combinados la sacarosa con el manitol (al 5%).

Por otro lado, al cabo de 2 meses se encontró la formación de un ensanchamiento en las base de las hojas semejante a un bulbo único (sin formación de dientes) a los cuales se les midió el diámetro y cuyos promedios se registraron en la tabla 23, la cual mostró que en el grupo testigo (1) y en el tratamiento 5, no se formaron estos ensanchamientos al cabo de tres meses, a diferencia de lo ocurrido con los tratamientos 3, 4, 7, 8, 11 y 12, en los cuales sí se formaron al cabo de dos meses de permanecer en fase II. Con el fin de conocer si estas diferencias aparentes son significativas se efectuó un análisis de varianza (tabla 23), el cual confirmó que fueron altamente significativas (al 1%). Al realizar la prueba de

Tukey (tabla 23), se descubrió que: 1) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos que tuvieron manital en el medio de cultivo durante la fase I, 2) además, éstos fueron diferentes al testigo y al tratamiento S.

De aquí que se infiera que el manital fué el causante de la formación de este ensanchamiento aún sin estar presente en el medio de cultivo durante la fase II, la gráfica 10 nos muestra más claramente esto. Para demostrarlo se realizó un análisis de varianza multifactorial (tabla 24) el cual reveló que: 1) la sacarosa no provocó esta respuesta (al 5%), 2) el manital produjo el efecto de ensanchamiento en la parte basal de la planta, pues mostró una diferencia altamente significativa (al 1%) y 3) al haber estado combinados ambos azúcares no hubo interacción en la respuesta al estar en la fase II (al 5%).

Es importante notar que sí influyó el manital en la formación de los bulbos, sin embargo, es probable que también haya influido la temperatura de 26°C y el fotoperiodo de 16 horas factores que favorecieron el desarrollo de bulbos (Messiaen, 1984). Brewster (1977) señaló que los días largos detienen rápidamente el crecimiento de las hojas y se inicia la maduración del bulbo. Esta maduración se caracteriza por la pérdida de turgencia en las células de la parte superior de la vaina o escama externa, provocando así que las hojas se doblen y comiencen a morir. Este mismo fenómeno se observó en las plantas al finalizar la Fase II (Brewster, 1977).

Roca et al. (1983), al estar trabajando la conservación de germoplasma *in vitro* de cultivos de *Cassava*, destacó dos

condiciones mínimas para su almacenamiento: 1) una mediana velocidad de crecimiento y 2) viabilidad de los clones almacenados.

Respecto a la velocidad de crecimiento, él recomendó una velocidad de crecimiento intermedia cuando está presente una altaconcentración osmótica pues a altas concentraciones de 0.5 % encontró daño a nivel celular para el caso de *Cassava*.

Ciertamente en el presente trabajo deseamos obtener un retardo del crecimiento de los ápices y que éstos, al ser transferidos a un medio libre de agentes osmóticos, logren una buena recuperación sin presentar daños.

Para la fase fisiológica A₁ la velocidad de crecimiento en la fase II fué mayor que en la fase I, lo cual indicó que las plantitas respondieron favorablemente al medio de recuperación (tabla 25). Los tratamientos 4 y 8 con 3 y 5 % de sacarosa más 7 % de manital, tuvieron respuestas ligeramente superiores de crecimiento, según lo obtenido en F II - F I (2.5 y 2.6 cm/mes). Sin embargo, se encontró que en general, las velocidades de crecimiento total (F II - F I), no fueron muy diferentes entre sí en todos los tratamientos que pasaron a la al medios de recuperación en la fase A₁. De esta manera podría pensarse que cualquiera de estos tratamientos es idóneo. No obstante, se encontraron anomalías severas en el desarrollo de los ápices en los tratamientos que estuvieron sometidos a 9 % de manital durante F I (tratamientos 11 y 12), como son por ejemplo: la formación de hojas nuevas delgadas y débiles con color verde amarillento, las hojas ya formadas durante la fase

de tratamiento crecieron lentamente, y al cabo de un mes se secaron, el tejido tuvo una textura rugosa y esponjosa, mostró también un ensanchamiento en la parte basal del ápice parecida a un bulbo. Los tratamientos con 7 % de manitol (trats. 4 y 8), no mostraron daños tan severos, sin embargo, el tejido de la planta, presentó una textura rugosa y esponjosa aunque no tan marcada como fue el caso anterior, mostró también un ensanchamiento en la parte basal de la planta.

Con todo esto podemos decir que las concentraciones de 7 y 9 % de manitol fueron tóxicas para el ajo. Así tenemos que, los tratamientos que mostraron las mejores respuestas fueron los tratamientos 3 y 7 con 3 y 5 % de sacarosa respectivamente más 5 % de manitol.

5.4 RECUPERACION DE APICES EN A₂

En lo referente a la longitud de las hojas obtenidas a los dos meses de permanecer en condiciones favorables de crecimiento, se encontró 100 % de sobrevivencia en todos los tratamientos (tabla 26), exceptuando los lotes en los tratamientos 1 y 5 ya explicadas anteriormente en el punto 5.3, en la misma tabla 45, se puede observar que aparentemente, los tratamientos que estuvieron expuestos a manitol en la fase I mostraron una menor longitud de sus hojas nuevas. Al efectuar un análisis de varianza (tabla 26), éste mostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos con una confianza (al 1%). La prueba de Tukey (tabla 26), nos reveló que todos los tratamientos fueron diferentes al

testigo con excepción del tratamiento 5. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que tuvieron manitol durante la fase I, sin embargo, los ápices en los tratamientos 11 y 12, sus hojas alcanzaron las longitudes más cortas (3.2 y 4.9 cm) mostrando diferencias significativas con el testigo y el tratamiento 5, donde las hojas alcanzaron longitudes de 24.1 y 21.5 cm respectivamente. Lo anterior nos llevó a pensar que es el manitol el agente que indujo el bajo crecimiento de las hojas. Al graficar los promedios (gráfica 11) se encontró una curva muy similar a la observada en la fase A (gráfica 7) y a la vez, ambas son semejantes a las gráficas 2 y 4. Al realizar un análisis de varianza multifactorial (tabla 27), se encontró una situación similar a la encontrada en la tabla 18 donde el manitol fue el agente responsable de la respuesta aún sin estar presente en esta fase II.

Respecto al número de hojas formadas, se observó en la tabla 28 que al finalizar los dos meses de la fase II, hubo una relación entre el número de hojas formadas y la concentración de manitol aplicado durante la fase I, posteriormente se realizó un análisis de varianza (tabla 28) el cual confirmó la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos (al 1 %). Al efectuar una prueba de Tukey (tabla 28) se encontró que los ápices que estuvieron bajo la acción del manitol durante la fase I (trats. 3, 4, 7, 8, 11 y 12), fueron diferentes al testigo y al tratamiento 5 en la fase II. Esto puede observarse mejor en la gráfica 12, esto es, que al

haber manitol se da una caída fuerte en la curva. Esto es muy similar a lo que se presentó en la gráfica 8, sin embargo, no se parecieron ambas gráficas a las observadas en la fase I para número de hojas (gráficas 3 y 5).

Lo anterior nos llevó a pensar que el manitol ejerció un efecto sobre la respuesta de los ápices, aún sin estar presente en el medio de cultivo.

El análisis de varianza multifactorial (tabla 29), mostró que efectivamente, el manitol fué el único agente causante de la baja formación de hojas en la fase II con una diferencia altamente significativo (1 %).

Lo anterior confirmó que el manitol ejerció efecto sobre la respuesta de los ápices, aún sin estar presente en el medio de cultivo. Además, las gráficas 8 y 12 son similares entre sí, esto no indica que la respuesta en A₁ y A₂ presentan un estado fisiológico similar además, esto se puede apoyar aún más al observar las gráficas 3 y 5, las cuales también se parecen entre sí.

En lo referente a la formación de raíces hubo mayor formación de raíces en aquellos tratamientos que no estuvieron bajo el efecto del manitol en la fase I (tabla 30).

Al realizar un análisis de varianza (tabla 30) se encontró que efectivamente si existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (al 1 %) nivel de confianza del 99% por lo que se realizó una prueba de Tukey (tabla 30) la cual demostró que: 1) con los ápices en los tratamientos 11 y 12 ocurrió la más baja formación de raíces y ambos tuvieron 9%

de manitol durante la fase I, 2) un segundo grupo (trats. 3, 7, 8, 4 y el testigo 1) no mostraron diferencias significativas en su respuesta y 3) en el tratamiento 5 se formó el mayor número de raíces, bajo las condiciones favorables de crecimiento (3, 4, 7, 8 y 11). Esto mismo lo pudimos observar al graficar las medias del número de raíces de estos tratamientos, (gráfica 13), ya que se ve una caída en el promedio de raíces formadas, aunque también se observó un aumento entre los tratamientos que tuvieron 5 y 7 % de manitol en la fase I, sin embargo, este aumento no fue significativo.

Al realizar un análisis de varianza multifactorial (tabla 31) se confirmó que el manitol es el agente causante de la baja respuesta a la formación de raíces nuevas su efecto fue altamente significativo (al 1 %), tampoco se dió una interacción al estar combinados la sacarosa con el manitol (al 5 %).

Con respecto al diámetro del "bulbo" podemos observar sus promedios en la tabla 32, la cual mostró que el grupo testigo (1) y en el tratamiento 5, no se formó este ensanchamiento al cabo de tres meses, en comparación con los tratamientos 3, 4, 7, 8, 11 y 12, en los cuales las hojas sí lo formaron al cabo de dos meses. El análisis de varianza (tabla 32),mostró una diferencia altamente significativa (al 1 %). Al realizar la prueba de Tukey (tabla 32), se encontró que: 1) el testigo y el tratamiento 5 formaron un grupo que carecían de "bulbo", 2) un segundo grupo de tratamientos que mostraron una respuesta significativamente similar fueron los tratamientos 3 y 7, los

cuales tuvieron 5 % de sacarosa durante la fase I y 3) un último grupo fue el de los tratamientos 4, 8, 11 y 12 los cuales tuvieron 7 y 9 % de manitol durante la fase I. Esto nos lleva a pensar nuevamente que el manitol fue el causante de la formación de este ensanchamiento aún sin estar presente en la fase II, la gráfica 14 mostró una subida en la curva. Al efectuar un análisis de varianza multifactorial (tabla 33) se encontró que : 1) el efecto del manitol fue altamente significativo (al 1 %) y 2) la combinación de ambos azúcares en F I produjo interacción durante la fase II (al 5 %).

Con esto podemos decir que el manitol influyó grandemente en la formación del "bulbo" (gráfica 14), pero también la sacarosa influyó al combinarse con el manitol durante el periodo de tratamiento. La gráfica 14 fue semejante a la gráfica 10. Puesto que los resultados para A₂ fueron muy similares a los encontrados en A₁, se tomaron en cuenta los mismos criterios que para la fase A₁, y así tenemos que los mejores tratamientos también fueron el 3 y el 7 (ver tablas 25 y 34).

5.5 EFECTO DE LA SACAROSA Y EL MANITOL EN A₀.

Los ápices de ajo en el medio con 3% de sacarosa y diferentes concentraciones de manitol, sometidos a baja temperatura (4°C), mostraron los siguientes resultados:

La tabla 35 mostró una disminución en la longitud de las hojas al aumentar la concentración de manitol. Al realizar un análisis de varianza (tabla 35) encontramos diferencias

altamente significativas entre los tratamientos con una confianza del 99 %. La prueba de Tukey (tabla 35), revelo la relación entre la reducción en la longitud de las hojas y la concentración de manitol, pues los tres tratamientos difirieron significativamente del testigo, ahora bien, encontramos que los tratamientos 2 y 4 también difieren, pero el 3 con 7% de manitol no mostró diferencias con ellos.

Lo anterior indicó que el manitol esta afectando al desarrollo de las hojas.

Esta disminución en el crecimiento de las hojas es muy similar a la encontrada en A₁ y A₂ (gráficas 2 y 4). Esto indica que el manitol influyó de la misma manera en las tres fases fisiológicas.

En cuanto al número de hojas formadas, no se encontró una relación aparente entre concentración de manitol y hojas formadas (tabla 36), sin embargo si se aprecia una cierta disminución de hojas al aumentar la concentración de manitol. El análisis de varianza (tabla 36) indicó que se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos con una confianza del 99 %. Al realizar la prueba de Tukey (tabla 36) encontramos que los tratamientos 2 y 4, con 3 y 7 % de manitol respectivamente, fueron diferentes significativamente con el testigo, en cambio el tratamiento 3 con 5% tuvo una respuesta semejante al testigo. Si observamos las gráficas 3 y 5, descubrimos que coincide en cuanto al aumento de número de hojas en relación al testigo, lo cual indica que el manitol al 5% favoreció la formación de hojas. Para los tres

casos se observó que cuando, se aumentó la sacarosa al 5%, disminuyó un poco el promedio de las hojas formadas.

Es interesante encontrar aquí un aumento en el número de hojas formadas al haber estado expuestos al manitol en un 5%, esta misma fue encontrada en las fases A₁ y A₂, esto nos permite descubrir que el manitol aumentó significativamente la formación de hojas en las tres fases y que, inclusive, es ligeramente mayor al testigo, lo cual indica que da la misma respuesta en estos tres diferentes estados fisiológicos.

Respecto a las raíces, se encontró un cierto aumento de ellas, al haber un aumento en la concentración de manitol (tabla 37). El análisis de varianza (tabla 37), demostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos con una confianza del 99 %. Al realizar la prueba de Tukey, se encontró que los tratamientos 3 y 4 fueron, significativamente diferentes al testigo, en cambio, el tratamiento 2, con 3% de manitol, tuvo una respuesta similar al testigo.

Lo anterior nos indica que las concentraciones de 5 y 7 % de manitol, favorecieron la formación de raíces. Además, en todos estos resultados, encontramos una influencia marcada por el manitol.

La respuesta anterior fue similar a la encontrada en la fase A₂ (gráfica 6).

5.6 RECUPERACION DE LOS APICES EN A₀.

Al subcultivar las plántulas a un medio libre de sacarosa y

manitol, en condiciones de 26°C, 2000 lux y fotoperiodo de 16 horas, encontramos las siguientes respuestas:

Al comparar la longitud de las hojas obtenidas a los 15 días (tabla 38), encontramos una mayor longitud en los tratamientos con las mayores concentración de manitol (F I). El análisis de varianza (tabla 38), indicó la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos. Al efectuar la prueba de Tukey (tabla 38), descubrimos que los tratamientos 3 y 4 con 1.8 y 3.4 cm respectivamente, fueron diferentes al testigo con 0.8 cm., el tratamiento 2 no mostró diferencias significativas con el testigo ni con el tratamiento 3, pero si con el 4. La gráfica 18 representa estos resultados.

Al parecer, la temperatura jugó un papel importante en el retardo de crecimiento encontrado aquí, ya que, mostró una menor velocidad de crecimiento en todos los tratamientos en general (tabla 41).

Respecto al número de hojas, encontramos que hubo cierto aumento en la formación de éstas, al aumentar la concentración de manitol (tabla 39). El análisis de varianza (tabla 39) mostró, que efectivamente, existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos (al 1%). Al realizar la prueba de Tukey (tabla 39) se encontró que los tratamientos 2 y 4 fueron diferentes del testigo (1.6 y 2.3 hojas respectivamente), en cambio el tratamiento 3 no fue diferente. La gráfica 19 representa estos resultados.

En lo que respecta a la formación de raíces encontramos que

sólo el tratamiento 4 (tabla 40) mostró la mayor formación de raíces nuevas (1.25 raíces), en general fue muy bajo el desarrollo de éstas, en todos los tratamientos. El análisis de varianza (tabla 40), mostró la existencia de diferencias altamente significativas entre los tratamientos (al 1 %). La prueba de Tukey indicó que, efectivamente, el tratamiento 4 fue diferente del resto de los tratamientos.

Los resultados anteriores nos dicen que el manitol influyó en el retardo de crecimiento de los ajos, pero además, este efecto estuvo aunado a la baja temperatura aplicada a ellos la cual también tuvo una fuerte participación en el bajo crecimiento. Esto apoya las observaciones y la sugerencias hechas por varios autores respecto a la conveniencia de usar bajas temperaturas para la conservación de germoplasma (El-Gizawy y Ford-Lloyd, 1987).

Puesto que la temperatura de 4°C favoreció la conservación de este material por 13 meses y el hecho de no encontrar daños aparentes en las plantas, bajo las condiciones de cultivo ensayadas, la aplicación de nuestros resultados podría la conservación de material genético de importancia por periodos de corto-mediano plazo.

5.7 EFECTO DEL PIQUEROL A EN A₂ LONGITUD DE HOJAS

En este experimento, cabe aclarar, que para probar el efecto del piquerol A, sólo se utilizó agua destilada estéril carente de sales y sacarosomas piquerol a diferentes concen-

traciones (tabla 4), esto se realizó así, ya que en una prueba preliminar que no se reporta aquí, con ápices en fase A₀ se encontró un crecimiento mínimo de éstos, los cuales se tornaron de color verde formando una o dos hojas y una talla muy corta, algunos desarrollaron 2 o 3 hojas. Sin embargo, por ser muy reducida la muestra no se efectuó un análisis estadístico. Se intentó por esto probar con ápices de ajo en fase A₂, para conocer su respuesta a estas condiciones.

El efecto de la falta total de nutrientes ha sido explorado exitosamente para la conservación de palmas por Nwankwo y Krikorian (1982), quienes almacenaron semillas de *Elaeis guineensis* forma *pisifera* en agua destilada estéril y muy baja concentración de CO₂ por 6 meses, obteniendo buenos porcentajes de recuperación al ponerlos en condiciones óptimas de germinación. Kartha et al. (1981), pudieron almacenar meristemas de café durante dos años con la mitad de la concentración de sales del medio MS y libre de sacarosa.

Se realizó una prueba preliminar con ápices en el estado fisiológico A₀ con agua destilada estéril carente de sales y sacarosa, ambas con diferentes concentraciones de piqueral A (tabla 4), al cabo de 4 meses, los ápices aún permanecían vivos y de una talla muy corta y algunos desarrollaron 2 o 3 hojas. Sin embargo, por ser muy reducida la muestra no se efectuó un análisis estadístico. Se intentó por esto probar con ápices de ajo en fase A₂, para conocer su respuesta a estas condiciones.

En vista de esto, los resultados en la fase A₂ fueron los

los siguientes:

Al exponer los apices de *Allium sativum* L. a las diferentes concentraciones de piqueral A, se analizaron los siguientes parámetros: longitud de las hojas, número de hojas y número de raíces. Las observaciones fueron realizadas al mes de tratamiento, ya que al cabo de este tiempo, se observaron daños severos. Sin embargo, se tomaron los datos de los parámetros antes mencionados y con estos, se obtuvo el siguiente análisis

Con respecto a la longitud de las hojas, se observó una caída en la longitud de estas al aumentar la concentración de piqueral A (tabla 42). Para delucidar esta conclusión preliminar, se efectuó un análisis de varianza (tabla 42), la cual no mostró diferencia significativa entre los tratamientos al 5 %. Esto demostró que el piqueral no afectó significativamente a la elongación de las hojas. La gráfica 21 mostró una tendencia a disminuir la longitud de las hojas al aumentar la concentración de piqueral, sin embargo los promedios de los tratamientos no fueron diferentes significativamente como ya lo indicó la tabla 42. En cambio, sí encontramos diferencias significativas entre los tratamientos (al 10 %).

Es clara, que el piqueral A sí influyó en la elongación de las hojas, ya que el testigo tuvo una longitud promedio de 7 cm. y la más alta concentración (30mg/l) sólo tuvo 3.4 cm.

En cuanto al efecto del piqueral en las hojas formadas, aparentemente no se observó una relación entre la concentración de piqueral y el número de hojas (tabla 43). Para conocer esto se efectuó un análisis de varianza (tabla 43) el

cual reveló diferencias significativas (al 5 %). Al efectuar la prueba de Tuckey (tabla 43) se encontraron diferencias significativas, entre los tratamientos que tuvieron 5 mg/l con un número de hojas promedio de 3.18 y 15 mg/l con un promedio de 5.8 hojas formadas. Sin embargo, no se observó una relación de la concentración de piqueral con el número de hojas formadas. La gráfica 22 mostró una cierta tendencia de disminución en el número de hojas al aumentar la concentración de piqueral, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza, los promedios resultaron ser significativos.

En lo que respecta al número de raíces formadas no se observó relación de estas con las concentraciones de piqueral (tabla 44). Al efectuar el análisis de varianza (tabla 44) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (al 5 %). Esto nos indica que el piqueral A, no afectó a la formación de las raíces. La grafica 23 muestra esto más claramente.

5.8 RECUPERACION DE LOS APICES EN A₂.

Ninguna de los ápices del punta 9 se recuperó, ya que al cabo de cuatro semanas de tratamiento, estos se mostraban de color blanco cremoso y aunque se sembraron en un medio de cultivo favorable para su crecimiento, estos no formaron hojas nuevas ni dieron muestras de una posible recuperación.

Como vemos, si ha habido efecto por parte del piqueral, sobre los ápices, pues existe una relación directa entre la

concentración de piqueral y la baja respuesta obtenida. Por otro lado, la muerte de estos explantes se debió, seguramente, a la falta de nutrientes en el medio de cultivo y al estado fisiológico de los ápices (Az), el cual exige una actividad metabólica y hormonal muy fuerte que el piqueral no detuvo. Se observó ensanchamiento en la base de las hojas, parecido a una bulbo, sin embargo, éste no formó hojas nuevas al transferirse al medio de recuperación. También se puede decir que el ensanchamiento encontrado se debió al fotoperíodo superior a 12 hrs. y a temperatura superior a 20°C, condiciones que según Messiaen (1974), inducen la formación de bulbo.

Dado que la sobrevivencia fue nula, no fue posible obtener la velocidad de crecimiento.

La única diferencia entre nuestro experimento preliminar y los resultados presentados aquí es el estado fisiológico, el cual pudo influir debido a los requerimientos energéticos que en el estado Az espera que presenten los explantes.

Velocidad de crecimiento.— Para poder determinar el mejor o mejores tratamientos es necesario conocer las velocidades de crecimiento y la sobrevivencia de los mismos (Roca, et al., 1983). Dado que la sobrevivencia en los diferentes tratamientos fue del 100%, las velocidades de crecimiento serán de gran ayuda para poder reconocer el tratamiento más adecuado.

En la tabla 44, encontramos para A diferentes velocidades de crecimiento que estuvieron relacionadas con la concentración de manitol. Las velocidades más bajas fueron las de las

tratamientos 11, 12, 4, con 0.9, 1.1 y 1.8 cm/mes, respectivamente, comparado contra el testigo que fue de 7 cm/mes.

Se intentó generar otro parámetro de medición, al obtener la diferencia entre F II - F I, debido a que las velocidades obtenidas en F I y en F II, no dan la tasa de crecimiento real, lo cual redundaría en una elección errónea. Así tenemos, que por ejemplo, el tratamiento 11 tuvo una velocidad de 0.9 cm/mes en F I y en la recuperación tuvo 3.4 cm/mes, en el caso del tratamiento 4 su velocidad en F I fue de 1.8 cm/mes y en F II fue de 4.2 cm/mes, en ambos casos la diferencia fue de 2.5 cm/mes. Así, se encontró que fue muy uniforme esta diferencia para todos los tratamientos. Sin embargo, el criterio que se tomó para elegir la mejor respuesta fue la que propuso Roca et al. (1983), quien recomendó las velocidades intermedias de recuperación, además es importante tomar en cuenta que en el intercambio genético, por ejemplo entre instituciones, pueden ocurrir problemas de transtransporte y cuarentena, lo cual prolonga la permanencia de las plantas en los medios de cultivo.

De esta manera, los tratamientos elegidos son el 4, 7 y 8 con 5 y 7% de manitol con 3 y 5% de sacarosa. Además, si se desea aplicar esto masivamente para conservar germoplasma, es importante tomar en cuenta los costos de la sacarosa y el manitol para elegir entre estos tres tratamientos.

Para Az se usó el mismo criterio y así encontramos que las mejores tratamientos fueron el 3, 4 y 7.

Respecto a los tratamientos sometidos a 4°C y oscuridad

(tabla 41), se encontró que las mejores tasas de crecimiento reales fueron las encontradas en los tratamientos 3 y 4, sin embargo, se escogieron los tratamientos 2 y 3 ya que el tratamiento 4 mostro una velocidad de crecimiento de 6.7 cm/mes siendo esta velocidad muy alta si se desea transportar material para intercambio genético.

Efecto de sacarosa y manitol .- Haciendo una comparación de los resultados obtenidos en las fases fisiológicas A₁ y A₂ al final del tratamiento, se encontró que en general, las respuestas fueron semejantes. La disminución en la longitud y en el número de las hojas formadas durante F I, se debió al efecto del manitol en ambas fases fisiológicas. Sin embargo, en A₂, no fue tan marcada la diferencia significativa entre los tratamientos que sólo tuvieron sacarosa, de los que tuvieron, además, manitol. Otra diferencia fue el efecto de interacción de ambos azúcares en la formación de hojas y raíces en A₂, esto nos planteó que en A₁ (punto de germinación) el azúcar es absorbido y metabolizado con mayor rapidez, pues le es necesario para su desarrollo. Esto, viene a ser contrastante con la obtenida por Rubluo y Kartha (1985) quienes encontraron que el manitol no fue esencial para reducir las tasas de crecimiento y la regeneración de meristemas de dos especies de *Phaseolus*, añadió que fue la sacarosa el agente inhibitor, además reportó que el manitol fue tóxico al 9 y 11%.

En este trabajo la respuesta contraria pudo deberse a que la sacarosa por ser la única fuente de carbono metabolizada

por los tejidos fue gastada rápidamente, de tal manera que, aunque estuvo presente a altas concentraciones en el medio de cultivo, el potencial osmótico no fue lo suficientemente alto para producir un efecto inhibitorio en el crecimiento. También podemos agregar, en base a lo encontrada en A₁ y en A₂ que el manitol produjo una respuesta contundente en la reducción del crecimiento, reflejada en un acortamiento de las hojas y en el número de éstas. A la concentración más baja de manitol (3%) pudo notarse el efecto inhibitorio y cuya osmolaridad fue de 381.0 mmol/kg (incluyendo 3% de sacarosa, (tabla 5) lo cual resalta al compararlo con la respuesta obtenida en el tratamiento que tuvo la más alta concentración de sacarosa (11%) cuya osmolaridad fue de 638.0 mmol/kg sin producir un efecto significativo. Esto nos confirmó que este azúcar no fue metabolizado por el ajo y queda fuera de las especies reportadas por Trip, et al. (1964) como capaces de metabolizar este azúcar. Así tenemos que el manitol actuó sobre los ápices de ajo como agente osmótico (Rubluo y Kartha 1985).

La presencia de interacción en el número de hojas y de raíces en A₂ (tablas 15 y 17), durante la fase de tratamiento probablemente se debió a que la sacarosa contribuyó al incremento en la presión osmótica del medio de cultivo, causando una severa plasmólisis en las células de los ápices. Además, pudo producir también una reducción del metabolismo y una reducción del área de la membrana celular (Pritchard et al. 1982). Esto podría explicar la presencia de una textura es-

ponjosa y arrugada en la hoja más externa del ápice ne los tratamientos que tuvieron 7 y 98 % de manitol.

Por otro lado, hay que tomar en cuenta que en esta fase A₂, las células estan preparadas para una activa división celular. Si la presión osmótica es alta, tambien pudo afectar a este mecanismo, reflejándose ésto en una disminución del desarrollo de raíces y número de hojas.

Baja temperatura (4°C).— Aunque no es comparable la fase A₀ con las fases A₁ y A₂ por pertenecer a etapas fisiológicas diferentes, sin embargo, pueden resaltarse algunas respuestas interesantes.

En primer término, podemos ver que en A₀ la longitud promedio del testigo fue 10.3 cm, la cual fue inferior a A₁ y A₂; el tiempo de almacenamiento fue mayor (13 meses), para los tratamientos 3 y 4, y mas aún para el tratamiento 2 y el testigo (tabla 34). Esta respuesta pudo deberse a varios factores como es la fase fisiológica, el efecto de manitol, no obstante la temperatura de 4°C muy probablemente favoreció la prolongación del periodo de almacenamiento.

El-Gizawi y Ford-Lloyd (1987) reportaron que no sobrevivió ninguna de los ápices de 3 cultivares de ajo incubados en medio B5 sin inductores osmóticos, incubados a 26°C durante 4 meses, en cambio, los ápices que permanecieron a 4°C, sobrevivieron entre un 40 y un 80% a los 16 meses. Aplicando lo anterior a nuestros resultados encontramos que, efectivamente, la temperatura ayudó a prolongar el tiempo de almacenamiento de los ápices ya que permanecieron vivos durante 13 meses,

además, la presencia de manitol favoreció la conservación de los mismos.

6 CONCLUSIONES .

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos decir, que sí se encontraron condiciones que retardaron el desarrollo de los ápices .

En primer término, tenemos, al manitol, el cual demostró actuar a la concentración mas baja que se probó de 3%, cuy osmolaridad en el medio de cultivo fue de 381.0 mmol/kg. Comparativamente, la sacarosa a una concentración de 7%, a una osmolaridad con el medio de cultivo fue de 401.0 mmol/kg, no mostró el mismo efecto inhibitor. La explicación de porque la sacarosa no produjo el efecto inhibitor encontrada por Rubluc y Kartha (1985 a) puede deberse a que la sacarosa, por ser la única fuente de carbono en el medio y por ser metabolizada por las plantas, estuvo consumiendose continuamente del medio de cultivo, bajando, así, su concentración y, por lo tanto, su osmolaridad, produciendo, al mismo tiempo, un crecimiento en los ápices.

De los resultados obtenidos con manitol, encontramos que para el caso del ajo, es probable que no se metabolizó, probablemente, por no tener las enzimas adecuadas para esto (Trip, 1964), además al estar presente la sacarosa en todos los tratamientos no tuvo la "necesidad" de utilizarla y probablemente sólo permaneció en los haces vasculares.

Por lo tanto, el retardo del crecimiento encontrado en las

fases fisiológicas A₁ y A₂, se debió a la presión osmótica provocada por el manitol y no por la sacarosa.

El manitol fue tóxico a las concentraciones de 7 y 9 %.

De los resultados aquí obtenidos, se encontró que la longitud de las hojas fue el parámetro que más reflejó el efecto de los inductores osmóticos probados.

Es probable que el manitol haya provocado alteraciones en los ápices y plantas, a nivel celular, cuando estos se sometieron a 7 y 9 % de manitol, se encontró la formación de un tejido esponjoso y rugoso.

Las concentraciones de 3 y 5 % de manitol, dieron las mejores respuestas.

De lo anterior, se puede decir que si fue posible retardar el crecimiento de los ápices en las fases fisiológicas A₁ y A₂. Es interesante realizar, en estudios posteriores, ensayos en la fase A₀ con el fin de encontrar la mejor respuesta.

Respecto a la temperatura de 4°C, se encontró que esta favoreció la prolongación del tiempo de almacenamiento. También se encontró que una combinación de baja temperatura con sacarosa y manitol, mejoró las condiciones de las plántulas. Esos resultados nos permiten ver que la combinación de temperatura y agentes osmóticos, son una posibilidad viable de aplicar para almacenar el ajo y probablemente para otras especies.

En cuanto al piquero A, este si mostró producir una reducción en la longitud de las hojas. Es necesario realizar un estudio más amplio sobre este compuesto, combinándolo con

medios mínimos y bajas temperaturas en diferentes fases fisiológicas.

Por otro lado, dado que la temperatura de 4°C prolongó el tiempo de almacenamiento de los ápices de ajo en la fase A0, es gran importancia realizar pruebas combinando ésta temperatura con piqueral A (0 a 30 mg/l) en estudios futuros.

TABLA 6. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL SOBRE LA LONGITUD DE LAS HOJAS, EN APICES DE AJO EN FASE A1, *in vitro*.
(ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY)

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	14	20.900	5.325	1.423	25.4
2	3	3	15	13.173	3.411	0.881	25.8
3	3	5	10	9.200	1.222	0.387	13.2
4	3	7	10	5.490	1.938	0.613	35.2
5	5	0	13	22.792	4.250	1.179	18.6
6	5	3	14	11.807	4.053	1.083	34.3
7	5	5	10	7.480	2.262	0.715	30.2
8	5	7	12	6.942	2.270	0.655	32.7
9	7	0	13	21.469	6.369	1.766	29.6
10	9	0	13	20.023	5.014	1.391	25.0
11	3	9	12	2.683	1.502	0.433	55.9
12	5	9	13	3.308	1.352	0.375	41.0
13	11	0	15	20.360	4.451	1.149	7.1

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	8466.6273	12	705.55227	47.895 **
Dentro de grupos	2224.4147	151	14.73122	
Total	10691.042	163		

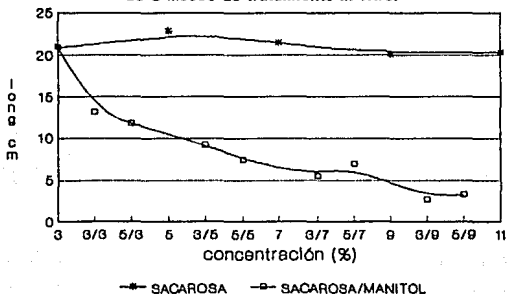
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS				
				1	2	3	4	5
11	3	9	2.683	*				
12	5	9	3.308	*				
4	3	7	5.490	*	*			
8	5	7	6.942	*	*	*		
7	5	5	7.480	*	*	*		
3	3	5	9.200		*	*	*	
6	5	3	11.807			*	*	
2	3	3	13.173				*	
10	9	0	20.023					*
13	11	0	20.360					*
1	3	0	20.900					*
9	7	0	21.469					*
5	5	0	22.792					*

Gráf. 2. Longitud de hojas de ápices de ajo en fase A1, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 3 meses de tratamiento in vitro.



* Condiciones de Incubación: 26 C.
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.

TABLA 7. INTERACCION EN AZ DE SACAROSA CON MANITOL (LONGITUD DE LAS HOJAS)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	1.2037	1	1.2037	0.117
MANITOL	5445.4281	4	1361.3570	132.777 * *

INTERACCION DE 2 FACTS.

SACAROSA vs MANITOL	65.16866	4	16.292166	1.589
RESIDUAL	1158.5879	113	10.252990	
TOTAL (CORR.)	6671.6546	122		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 8. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL NUMERO DE LAS HOJAS, EN APICES DE AJO EN FASE A1, *in vitro*.
(ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY)

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	14	5.500	1.345	0.359	24.4
2	3	3	15	4.400	1.183	0.306	26.8
3	3	5	10	5.500	1.369	0.401	23.0
4	3	7	10	4.000	1.414	0.447	35.3
5	5	0	13	4.923	1.320	0.366	26.8
6	5	3	14	3.786	0.802	0.214	21.1
7	5	5	10	5.000	1.826	0.577	36.5
8	5	7	12	4.500	1.243	0.359	27.6
9	7	0	13	4.308	1.032	0.286	23.9
10	9	0	13	4.077	0.954	0.265	23.4
11	3	9	12	3.417	1.240	0.358	36.2
12	5	9	13	3.308	0.947	0.263	28.6
13	11	0	15	4.067	1.033	0.267	25.3

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F
Entre grupos	72.99727	12	6.0831055	4.210 **
Dentro de grupos	218.19176	151	1.4449785	
Total	291.18902	163		

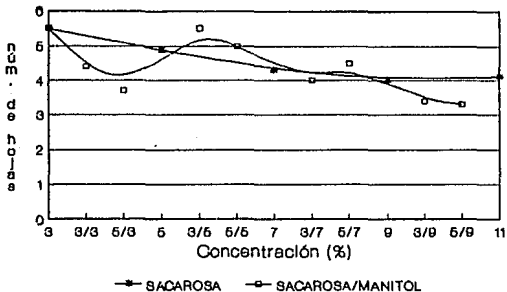
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
12	5	9	13	3.3076923	1 2 3
11	3	9	12	3.4166667	*
6	5	3	14	3.7857143	**
4	3	7	10	4.0000000	** *
13	11	0	15	4.0666667	** *
10	9	0	13	4.0769231	** *
9	7	0	13	4.3076923	** *
2	3	3	15	4.4000000	** *
8	5	7	12	4.5000000	** *
5	5	0	13	4.9230769	**
7	5	5	10	5.0000000	** *
1	3	0	14	5.5000000	*
3	3	5	10	5.5000000	*

Gráf. 3. Número de hojas formadas en ápices de ajo, en fase A1, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 3 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 20 C.
2 000 lux y fotoperíodo de 18 hrs.

TABLA 9. INTERACCION EN A1 DE SACAROSA CON MANITOL (NUMERO DE HOJAS)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	2.518598	1	2.518598	1.585
MANITOL	62.077641	4	15.519410	9.766 **
INTERAC. 2 FACTS.				
SAC vs MAN	5.1452425	4	1.2863106	.809
RESIDUAL	179.56612	113	1.5890807	
TOTAL	249.85366	122		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 10. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL SOBRE EL NUMERO DE LAS RAICES, EN APICES DE AJO EN FASE A1, *in vitro*. (ANALISIS DE LA VARIANZA)

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	14	10.643	8.828	2.359	82.9
2	3	3	15	11.733	8.268	2.135	70.4
3	3	5	10	9.400	6.204	1.962	65.9
4	3	7	10	13.000	6.146	1.944	47.2
5	5	0	13	14.692	5.879	1.631	40.0
6	5	3	14	12.429	6.572	1.756	52.8
7	5	5	10	13.900	6.244	1.975	44.9
8	5	7	12	12.083	4.582	1.323	37.9
9	7	0	13	15.462	6.213	1.723	40.1
10	9	0	13	14.927	7.488	2.077	50.1
11	3	9	12	7.917	6.529	1.885	82.4
12	5	9	13	12.000	6.916	1.918	57.6
13	11	0	15	11.333	9.279	2.396	81.8

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	698.1316	12	58.177636	1.156
Dentro de grupos	7598.9659	151	50.324278	
Total	8297.0976	163		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 11. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN A2, PARA LA LONGITUD DE HOJAS, ANALISIS DE VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	14	24.114	5.255	1.405	21.7
2	3	3	15	14.453	4.071	1.051	28.1
3	3	5	10	10.180	2.211	0.699	21.7
4	4	7	10	6.890	3.860	1.221	56.0
5	5	0	13	21.308	5.379	1.492	25.0
6	5	3	14	12.171	3.236	0.865	26.5
7	5	5	10	10.300	1.741	0.551	16.9
8	5	7	12	7.183	1.740	0.502	24.2
9	7	0	13	20.215	6.018	1.669	29.7
10	9	0	13	18.215	3.772	1.046	20.7
11	3	9	12	6.208	1.972	0.569	31.7
12	5	9	13	7.608	1.568	0.435	20.6
13	11	0	15	19.527	6.937	1.791	35.5

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	6001.8157	12	500.15131	28.345 * *
Dentro de grupos	2664.4555	151	17.64540	
Total	8666.2712	163		

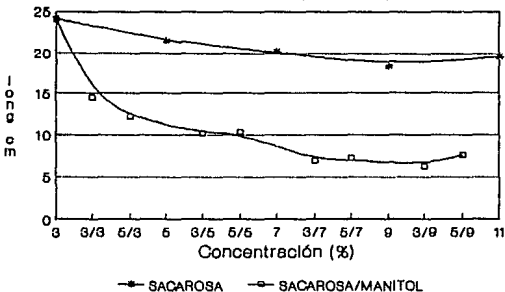
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS					
					1	2	3	4	5	6
11	3	9	12	6.208333	*					
4	4	7	10	6.890000	**					
8	5	7	12	7.183333	**					
12	5	9	13	7.607692	**					
3	3	5	10	10.180000	**	*				
7	5	5	10	10.300000	**	**				
6	5	3	14	12.171429		**				
2	3	3	15	14.453333		*	*			
10	9	0	13	18.215385			*	*	*	
13	11	0	15	19.526667			*	*	*	*
9	7	0	13	20.215385			*	*	*	*
5	5	0	13	21.492308			*	*	*	*
1	3	0	14	24.114286			*	*	*	*

Gráf. 4. Longitud de hojas de ápices de ajo en fase A2, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 3 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 28 C, 2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.

TABLA 12. INTERACCION EN A2 DE SACAROSA CON MANITOL (LONGITUD DE LAS HOJAS)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	17.6459	1	17.6459	1.439
MANITOL	4416.8212	4	1104.2053	90.069 **

INTERACCION DE 2 FACTS.

SAC. vs.MAN.	79.162203	4	19.790551	1.614
RESIDUAL	1385.3323	113	12.259578	
TOTAL	5926.0800	122		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 13. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN A2 PARA EL NUMERO DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	14	5.357	0.929	0.248	17.3
2	3	3	15	4.133	0.640	0.165	15.4
3	3	5	10	5.600	1.080	0.340	19.1
4	3	7	10	3.700	1.252	0.396	33.8
5	5	0	13	4.154	1.345	0.373	32.3
6	5	3	14	3.643	0.842	0.225	23.0
7	5	5	10	5.300	1.337	0.423	25.2
8	5	7	12	4.083	0.669	0.193	16.3
9	7	0	13	3.923	0.954	0.265	24.3
10	9	0	13	3.846	0.801	0.222	20.8
11	3	9	12	3.500	0.674	0.195	19.2
12	5	9	13	3.846	0.899	0.249	23.3
13	11	0	15	4.133	0.516	0.133	12.4

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	67.68566	12	5.6404714	6.531 **
Dentro de grupos	130.41190	151	.8636550	
Total	198.09756	163		

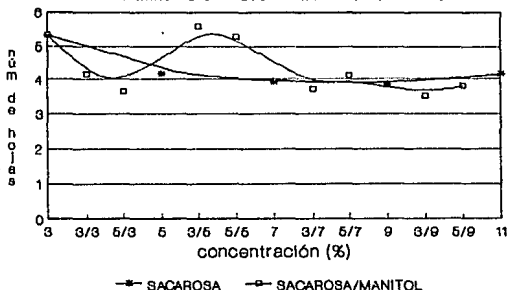
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS			
					1	2	3	4
11	3	9	12	3.5000000	*			
6	5	3	14	3.6428571	*			
4	3	7	10	3.7000000	*			
10	9	0	13	3.8461538	*			
12	5	9	13	3.8461538	*			
9	7	0	13	3.9230769	*			
8	5	7	12	4.0833333	*	*		
2	3	3	15	4.1333333	*	*		
13	11	0	15	4.1333333	*	*		
5	5	0	13	4.1538462	*	*	*	
7	5	5	10	5.3000000	*	*	*	
1	3	0	14	5.3571429	*	*	*	
3	3	5	10	5.6000000	*	*	*	*

Gráf. 5. Número de hojas formadas en ápices de ajo, en fase A1, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 3 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 10 hrs.

TABLA 14. INTERACCION EN A2 DE SACAROSA CON MANITOL
(NUMERO DE HOJAS)

Variación	Suma de cuad. g.l.	Media de cuad.	F
EXP1G.SACAROSA2	2.589018	1	2.589018
EXP1G.MANITOL2	49.865603	4	12.466401
			2.707
			13.036 * *

INTERAC 2 FACTS

SAC vs MANI	10.912299	4	2.7280748	2.853 *
RESIDUAL	108.06319	113	.9563114	
TOTAL	171.86992	122		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 15. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN A2 PARA EL NUMERO DE RAICES, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	14	10.571	7.398	1.977	69.9
2	3	3	15	9.267	6.902	1.782	74.4
3	3	5	10	13.500	5.930	1.875	43.9
4	3	7	10	14.500	6.241	1.973	43.0
5	5	0	13	16.231	7.960	2.208	49.0
6	5	3	14	15.214	6.716	1.795	44.1
7	5	5	10	12.100	6.822	2.157	56.3
8	5	7	12	11.333	5.959	1.720	52.5
9	7	0	13	8.538	9.198	2.551	107.7
10	9	0	13	14.385	6.450	1.789	44.8
11	3	9	12	9.417	5.248	1.515	55.7
12	5	9	13	9.231	5.310	1.473	57.5
13	11	0	15	15.200	8.946	2.310	58.8

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	1162.2002	12	96.850013	1.956 *
Dentro de grupos	7477.5255	151	49.520036	
Total	8639.7256	163		

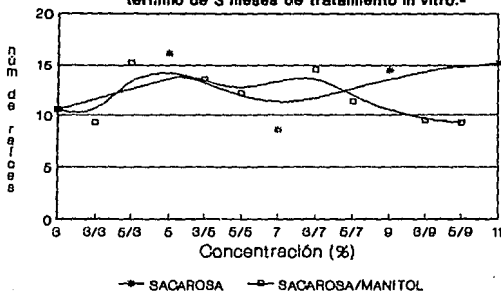
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS			
					1	2	3	4
9	7	0	13	8.538462	*			
12	5	9	13	9.230769	**			
2	3	3	15	9.266667	**			
11	3	9	12	9.416667	**			
1	3	0	14	10.571429	**	*		
8	5	7	12	11.333333	**	**	*	
7	5	5	10	12.100000	**	**	**	*
3	3	5	10	13.500000	*	**	**	*
10	9	0	13	14.384615	**	**	*	
4	3	7	10	14.500000	*	**	*	
13	11	0	15	15.200000	**	*	*	
6	5	3	14	15.214286	**	*	*	
5	5	0	13	16.230769	*	*	*	*

Gráf. 6. Número de raíces formadas en ápices de ajo, en fase A1, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 3 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 20 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.

TABLA 16. INTERACCION EN AZ DE SACAROSA CON MANITOL
(NUMERO DE RAICES)

Variación	Suma de cuad. g.l.	Media de cuad.	F
EXP16.SACAROSA	101.44185	1	101.44185
EXP16.MANITOL2	256.12922	4	64.03230
INTERAC 2 FACTS			
SAC vs MANI	435.32192	4	108.83048
RESIDUAL	4842.8178	113	42.856794
TOTAL	5630.7967	122	

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 17. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN A1, PARA LA LONGITUD DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)	SOBREVIV. (%)
1	14	20.900	5.325	1.423	25.4	0.0
3	10	10.700	5.208	1.647	48.7	100.0
4	10	8.580	3.660	1.157	42.7	100.0
5	13	22.792	4.250	1.179	18.6	0.0
7	10	9.640	5.695	1.801	59.1	100.0
8	10	9.820	5.956	1.883	60.7	100.0
11	12	6.842	2.136	0.616	31.2	100.0
12	13	5.285	3.599	0.998	68.1	100.0

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA DE CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupo	3759.9386	7	537.13408	25.537 **
Dentro de grupos	1766.8313	84	21.03371	
Total	5526.7699	91		

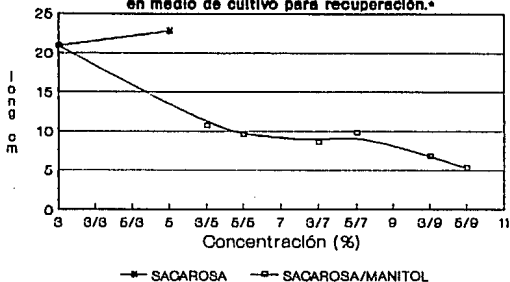
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
			1 2
12	13	5.284615	*
11	12	6.841667	*
4	10	8.580000	*
7	10	9.640000	*
8	10	9.820000	*
3	10	10.700000	*
1	14	20.900000	*
5	13	22.792308	*

Gráf. 7. Efecto de sacarosa y manitol en la longitud de las hojas nuevas de ápices de ajo en A1, in vitro en medio de cultivo para recuperación.*



Condiciones de incubación : 26 C,
2 000 lux y fotoperiodo de 16 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 18. INTERACCION EN A1 DE SACAROSA CON MANITOL (LONGITUD DE LAS HOJAS)

VARIACION	SUMA DE CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	0.6754	1	0.6754	0.032
MANITOL	3707.3638	3	1235.7879	58.753 **
INTERAC 2 FACTS				
SAC vs MANIT	51.896394	3	17.298798	0.822 .4851
RESIDUAL	1766.8313	84	21.033706	
TOTAL	5526.7699	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 19. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN A1, PARA EL NUMERO DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	14	5.500	1.345	0.359	24.4
3	10	3.100	2.183	0.690	70.4
4	10	2.500	1.714	0.543	68.6
5	13	4.923	1.320	0.366	26.8
7	10	2.700	2.110	0.668	78.2
8	10	2.000	1.414	0.447	70.7
11	12	2.170	1.193	0.344	55.1
12	13	2.154	1.573	0.436	73.1

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA DE CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	161.45708	7	23.065297	8.917 * *
Dentro de grupos	217.28205	84	2.586691	
Total	378.73913	91		

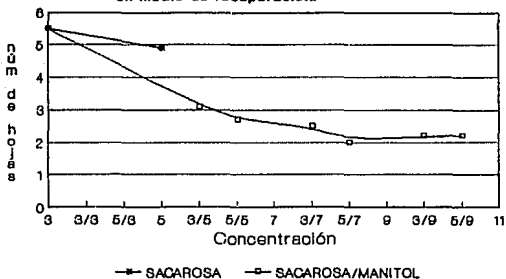
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM	n	MEDIDAS	GRUPOS HOMOGENEOS
8	10	2.0000000	1 2 3
12	13	2.1538462	*
11	12	2.1666667	*
4	10	2.5000000	*
7	10	2.7000000	*
3	10	3.1000000	* *
5	13	4.9230769	* *
1	14	5.5000000	*

Gráf. 8. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de hojas nuevas en ápices, en A1 in vitro en medio de recuperación.*



Condiciones de incubación : 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 18 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 20. INTERACCION EN A1 DE SACAROSA CON MANITOL (NUMERO DE HOJAS)

VARIACION	SUMA DE CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	3.12096	1	3.12096	1.207
MANITOL	155.93560	3	51.978534	20.095 **

INTERAC 2 FACTS

SAC vs MANIT	1.1736508	3	.3912149	.151
RESIDUAL	217.28205	84	2.5866911	
TOTAL	378.73913	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 21. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN A1, PARA EL NUMERO DE RAICES, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	14	10.643	8.828	2.359	82.9
3	10	4.900	3.446	1.090	70.3
4	10	2.800	3.048	0.964	108.8
5	13	14.692	5.879	1.631	40.0
7	10	2.800	2.251	0.712	80.3
8	10	1.700	1.252	0.396	73.6
11	12	3.167	3.157	0.911	99.7
12	13	9.000	4.564	1.266	50.7

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA DE CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	1853.2259	7	264.74654	10.913 **
Dentro de grupos	2037.8502	84	24.26012	
Total	3891.0761	91		

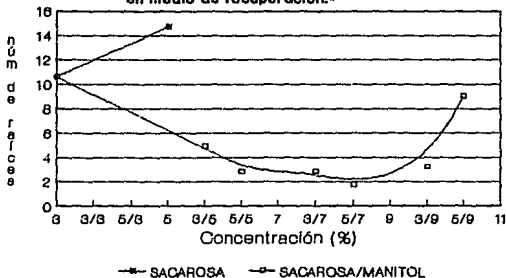
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS			
			1	2	3	4
8	10	1.700000	*			
4	10	2.800000	**			
7	10	2.800000	**			
11	12	3.166667	**			
3	10	4.900000	**	*		
12	13	9.000000	*	**	*	
1	14	10.642857	*	**		
5	13	14.692308	*			

Gráf. 9. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de raíces nuevas de ápices de ajo, en A1, in vitro en medio de recuperación.*



Condiciones de incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 22. INTERACCION EN A1 DE SACAROSA CON MANITOL (NUMERO DE RAICES)

VARIACION	SUMA DE CUAD	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	98.9932	1	98.99318	4.080 *
MANITOL	1515.1529	3	505.05098	20.818 **
INTERAC 2 FACTS				
SAC vs MAN	251.97515	3	83.991717	3.462 *
RESIDUAL	2037.8502	84	24.260121	
TOTAL	3891.0761	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 23. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJG EN A1, PARA EL DIAMETRO DE BULBO, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	14	0.000	0.000	0.000	0.000
3	10	1.500	0.447	0.141	29.810
4	10	1.600	0.291	0.092	18.200
5	13	0.000	0.000	0.000	0.000
7	10	1.360	0.217	0.069	16.000
8	10	1.490	0.251	0.079	16.900
11	12	1.300	0.283	0.082	21.800
12	13	1.323	0.339	0.094	25.700

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad.	g.l	Media de cuad.	F
Entre grupos	39.232945	7	5.6047064	80.947 * *
Dentro de grupos	5.816077	84	.0692390	
Total	45.049022	91		

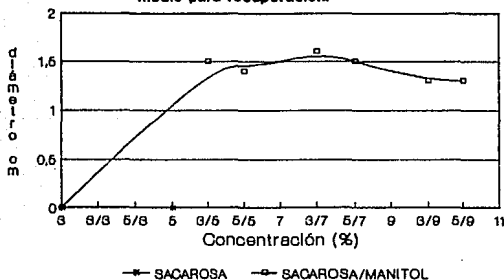
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
			1 2
1	14	.0000000	*
5	13	.0000000	*
11	12	1.3000000	*
12	13	1.3230769	*
7	10	1.3600000	*
8	10	1.4900000	*
3	10	1.5000000	*
4	10	1.6000000	*

Gráf. 10. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de bulbo, en ápices de ajo in vitro, en A1, en medio para recuperación.*



Condiciones de incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 18 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 24. INTERACCION EN A1 DE SACAROSA CON MANITOL (FORMACION DEL BULBO)

Variación	Suma de cuad.	g.l	Media de cuad.	F
EIAR.SACAROSA	0.053229	1	0.053229	0.769
EIAR.MANITOL	39.115546	3	13.038515	188.312 * *
INTERAC 2 FACTS				
SAC vs MANIT	0.1085943	3	0.0361981	0.523
RESIDUAL	5.8160769	84	0.0692390	
TOTAL	45.049022	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 25. Velocidades de crecimiento de los ápices de ajo *A. sativum* en las fases fisiológicas A₁ y A₂ sometidos a sacarosa y manitol.

No. Tratam.	A ₁			A ₂		
	F I cm/mes	F II cm/mes	F II - F I cm/mes	F I cm/mes	F II cm/mes	F II - F I cm/mes
1	7.0	—	—	8.0	—	—
2	4.4	—	—	4.8	—	—
3	3.1	5.4	2.3	3.4	6.3	2.9
4	1.8	4.3	2.5	2.3	5.2	2.9
5	7.6	—	—	7.1	—	—
6	3.9	—	—	4.1	—	—
7	2.5	4.8	2.3	3.4	4.0	0.6
8	2.3	4.9	2.6	2.4	5.7	3.3
9	7.2	—	—	6.7	—	—
10	6.7	—	—	6.1	—	—
11	0.9	3.4	2.5	2.1	1.6	- 0.5
12	1.1	2.6	2.4	2.5	2.4	- 0.1
13	6.8	—	—	6.5	—	—

TABLA 26. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN A2, PARA LA LONGITUD DE LAS HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)	SOBREVIV. (%)
* 1	14	24.114	5.255	1.405	21.7	0.0
3	10	12.570	2.384	0.754	18.9	100.0
4	10	10.410	4.503	1.424	43.2	100.0
5	13	21.492	5.379	1.492	25.0	0.0
7	10	7.920	5.857	1.852	74.0	100.0
8	10	11.370	3.769	1.192	33.1	100.0
11	13	3.238	3.773	1.046	116.5	100.0
12	12	4.850	4.728	1.365	97.5	100.0

* TESTIGO

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad.	g.l	Media de cuad.	F
Entre grupos	5022.2189	7	717.45984	33.610 **
Dentro de grupos	1793.1341	84	21.34684	
Total	6815.3530	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

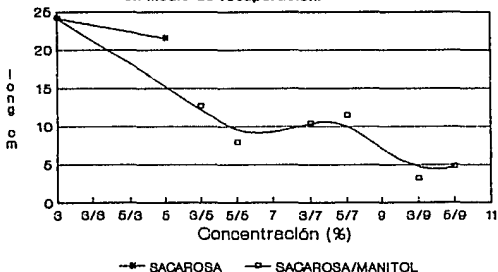
** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS		
			1	2	3
11	13	3.238462	*		
12	12	4.850000	*	*	
7	10	7.920000	*	*	*
4	10	10.410000	*	*	
8	10	11.370000		*	*
3	10	12.570000		*	*
5	13	21.492308			*
* 1	14	24.114286			*

* TESTIGO

Gráf. 11. Efecto de sacarosa y manitol en la longitud de las hojas nuevas de ápices de ajo in vitro, en A2, en medio de recuperación.*



Condiciones de incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.,
* 1/2MS+ 3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 27. INTERACCION EN A1 DE SACAROSA CON MANITOL (LONGITU DE HOJAS)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F	
SACAROSA	29.5702	1	6.5002	.444	
MANITOL	4844.5554	3	1614.8518	75.648	**
INTERACCION DE 2 FACTS.					
SACAROSA vs MANITOL	145.69699	3	48.565664	2.275	+
RESIDUAL	1793.1341	84	21.346835		
TOTAL	6815.3530	91			

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %
** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %
+ DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 10 %

TABLA 28. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN AZ, PARA EL NUMERO DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
* 1	14	5.357	0.863	0.929	17.3
3	10	2.900	2.322	1.524	52.5
4	10	2.200	1.733	1.317	59.8
5	13	4.154	1.808	1.345	32.3
7	10	2.500	6.055	2.460	98.4
8	10	2.500	2.278	1.509	60.4
11	13	1.231	3.026	1.739	141.4
12	12	0.917	0.811	0.900	98.2

* TESTIGO

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	195.44513	7	27.920734	12.368 *
Dentro de grupos	189.63095	84	2.257511	
Total	385.07609	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

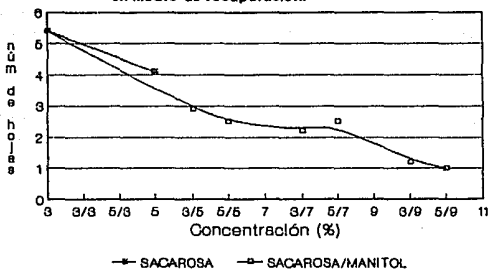
* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

MAN (%)	n	MEDIDAS	GRUPOS HOMOGENEOS
			1 2 3
12	12	0.9166667	*
11	13	1.2307692	*
4	10	2.2000000	* *
7	10	2.5000000	* *
8	10	2.5000000	* *
3	10	2.9000000	* *
5	13	4.1538462	* *
* 1	14	5.3571429	*

* TESTIGO

Gráf. 12. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de hojas nuevas, en ápices de ajo in vitro, en A2, en medio de recuperación.*



Condiciones de incubación: 26 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 29. INTERACCION EN A2 DE SACAROSA CON MANITOL (NUMERO DE HOJAS)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	4.86270	1	4.862697	2.154
MANITOL	183.69587	3	61.231955	27.124 **

INTERACCION DE 2 FACTS.

SACAROSA vs MANITOL	6.7630168	3	2.2543389	.999
RESIDUAL	189.63095	84	2.2575113	
TOTAL	385.07609	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 30. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN A2, PARA EL NUMERO DE RAICES ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
* 1	14	10.571	7.398	1.977	69.9
3	10	3.300	5.716	1.808	173.2
4	10	7.500	4.950	1.565	65.9
5	13	16.231	7.960	2.208	49.0
7	10	3.600	4.502	1.423	127.1
8	10	6.800	6.579	2.081	96.7
11	13	0.692	1.931	0.536	279.0
12	12	1.250	2.427	0.845	234.2

* TESTIGO

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	2429.5467	7	347.07810	10.809 **
Dentro de grupos	2697.3555	84	32.11137	
Total	5156.9022	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

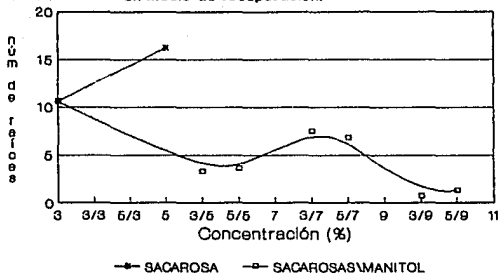
** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM	n	MEDIDAS	GRUPOS HOMOGENEOS		
			1	2	3
11	13	0.692308	*		
12	12	1.250000	*		
3	10	3.300000	*	*	
7	10	3.600000	*	*	
8	10	6.800000	*	*	
4	10	7.500000	*	*	
* 1	14	10.571429	*	*	*
5	13	16.230769	*	*	*

* TESTIGO

Gráf. 13. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de raíces nuevas de ápices de ajo in vitro, en A2, en medio de recuperación.*



Condiciones de incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 31. INTERACCION EN A2 DE SACAROSA CON MANITOL (NUMERO DE RAICES)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	68.3351	1	68.33505	2.128
MANITOL	2211.0965	3	737.03216	22.952 **
INTERACCION DE FACTS				
SACAROSA vs MANITOL	152.39908	3	50.799694	1.582
RESIDUAL	2697.3555	84	32.111375	
TOTAL	5126.9022	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 32. EFECTO DE SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN A2, PARA EL DIAMETRO DE BULBO, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
* 1	14	0.000	0.000	0.000	0.0
3	10	1.130	0.221	0.070	19.5
4	10	1.510	0.173	0.055	11.4
5	13	0.000	0.000	0.000	0.0
7	10	1.240	0.232	0.073	18.7
8	10	1.410	0.251	0.080	17.8
11	13	1.392	0.161	0.045	11.5
12	12	1.600	0.295	0.085	18.4

* TESTIGO

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
Entre grupos	38.3126	7	5.4732217	151.621 **
Dentro de grupos	3.0322	84	0.0360980	
Total	41.3448	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

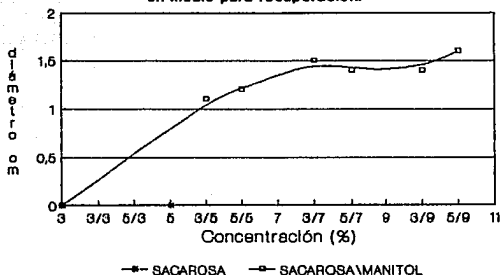
** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM	n	MEDIDAS	GRUPOS HOMOGENEOS
			1 2 3 4
* 1	14	.0000000	*
5	13	.0000000	*
3	10	1.1300000	*
7	10	1.2400000	* *
11	13	1.3923077	* *
8	10	1.4100000	* *
4	10	1.5100000	*
12	12	1.6000000	*

* TESTIGO

Gráf. 14. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de bulbo en ápices de ajo in vitro, en A2, en medio para recuperación.*



Condiciones de Incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.,
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 2 meses

TABLA 33. INTERACCION EN A2 DE SACAROSA CON MANITOL (FORMACION DEL BULBO)

VARIACION	SUMA CUAD.	G.L.	MEDIA CUAD.	F
SACAROSA	.0788	1	0.0788	2.184
MANITOL	37.9031	3	12.6344	350.002 * *

INTERACCION DE 2 FACTS.

SACAROSA vs MANITOL	.3008	3	0.1003	2.778 *
RESIDUAL	3.0322	84	0.0361	
TOTAL	41.3448	91		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

TABLA 34. Resultados generales obtenidos en las fases fisiológicas A₁, A₂ y A₃ sometidos a diferentes concentraciones de sacarosa y manitol y a diferentes condiciones ambientales.

Para A₁, con 26°C, 2 000 lux y fotoperiodo de 16 hrs.

TRAT.	Almacenamiento			Recuperación		OBSERVACIONES
	X L h (cm)	R. C. (%)	V. C. (cm/mes)	X L h (cm)	V. C. (cm/mes)	
1	20.90	—	7.0	—	—	CONTROL
2	13.17	36.80	4.4	—	—	— *
3	9.20	55.98	3.1	10.70	5.4	B
4	5.49	73.73	1.8	8.58	4.3	B
5	22.79	-9.04	7.6	—	—	— *
6	11.81	43.50	3.9	—	—	— *
7	7.48	64.20	2.5	9.64	4.8	B
8	6.94	66.78	2.3	9.82	4.9	B
9	21.47	-2.72	7.2	—	—	— *
10	20.02	4.19	6.7	—	—	— *
11	2.68	87.16	0.9	6.84	3.4	B
12	3.31	84.17	1.1	5.28	2.6	B
13	20.36	2.58	6.8	—	—	— *

B FORMACION DE BULBO EN FASE DE RECUPERACION

— * NO PASARON A LA FASE DE RECUPERACION

— POR TENER LONGITUDES MUY ALTAS.

X L h PROMEDIO DE LA LONGITUD DE LA HOJA

R. C. REDUCCION DE CRECIMIENTO

V. C. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

TABLA 34. (CONTINUACION)

Para A₂, con 26°C, 2 000 lux y fotoperiodo de 16 hrs.

TRAT.	Almacenamiento			Recuperación		OBSERVACION
	X L h (cm)	R. C. (%)	V. C. (cm/mes)	X L h (cm)	V. C. (cm/mes)	
1	24.11	—	8.0	—	—	CONTROL
2	14.45	40.06	4.8	—	—	— *
3	10.18	57.78	3.4	12.57	6.3	B
4	6.89	71.43	2.3	10.41	5.2	B
5	21.31	11.63	7.1	—	—	— *
6	12.17	49.52	4.1	—	—	— *
7	10.30	57.28	3.4	7.92	4.0	B
8	7.18	70.21	2.4	11.37	5.7	B
9	20.21	14.17	6.7	—	—	— *
10	18.21	24.46	6.1	—	—	— *
11	6.20	74.25	2.1	3.23	1.6	B
12	7.60	68.44	2.5	4.85	2.4	B
13	19.53	19.02	6.5	—	—	— *

B FORMACION DE BULBO EN FASE DE RECUPERACION

— * NO PASARON A LA FASE DE RECUPERACION

— POR TENER LONGITUDES MUY ALTAS.

X L h PROMEDIO DE LALONGITUD DE LA HOJA

R. C. REDUCCION DE CRECIMIENTO

V. C. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

TABLA 34. (CONTINUACION)

Para A₀, con 4 °C, y oscuridad

TRAT.	Almacenamiento			Recuperación		OBSERVACIONES
	X L h (cm)	R. C. (%)	V. C. (cm/mes)	X L h (cm)	V. C. (cm/mes)	
1	10.35	—	0.8	0.84	1.7	B CONTROL
2	6.67	35.50	0.5	1.30	2.6	B
3	5.54	46.50	0.4	1.80	3.6	B
4	4.38	57.60	0.3	3.40	7.0..	B

B _ FORMACION DE BULBO EN FASE DE RECUPERACION

X L h PROMEDIO DE LALONGITUD DE LA HOJA

R. C. REDUCCION DE CRECIMIENTO

V. C. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO

Para A₂, con 26°C, 2 000 lux y fotoperiodo de 16 hrs con diferentes concentraciones de piqueral A.

Almacenamiento

TRAT.	X L h (cm)	R. C. (%)	V. C. (cm/mes)
1	7.00	—	5.80
2	7.99	-14.14	6.78
3	7.73	-10.42	6.53
4	5.42	22.57	4.22
5	6.16	12.00	4.96
6	3.46	50.57	2.24

TABLA 35. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN AO PARA LA LONGITUD DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRAT.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	11	10.345	2.959	0.892	28.6
2	3	3	15	6.667	1.805	0.466	27.0
3	3	5	16	5.544	0.575	0.144	10.3
4	3	7	16	4.388	0.579	0.145	13.1

ANALISIS DE VARIANZA

VARIACION	SUM DE CUADRAD	.G.L.	MEDIA DE CUAD.	F
ENTRE GRUPOS	248.79373	3	82.931242	31.274 * *
DENTRO DE GRUPS.	142.19748	54	2.651805	
TOTAL	391.99121	57		

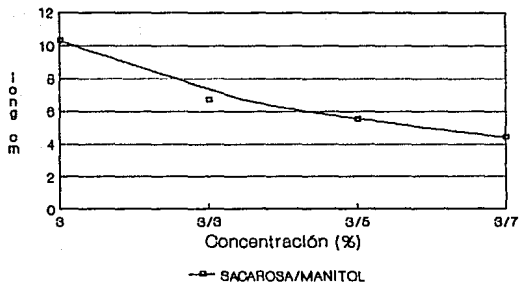
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALATAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS		
			1	2	3
4	16	4.387500	*		
3	16	5.543750	* *		
2	15	6.666667	*		
1	11	10.345455		*	

Gráf. 15. Longitud de hojas de ápices de ajo en fase A1, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 13 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación : 4 C y oscuridad.

TABLA 36. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN AO PARA EL NUMERO DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	11	5.091	0.831	0.251	14.3
2	3	3	15	4.067	0.594	0.153	69.6
3	3	5	16	5.625	0.619	0.155	43.3
4	3	7	16	3.565	0.512	0.128	37.5

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad	g.l.	Media de cuad.	F
ENTRE GRUPOS	40.814903	3	13.604968	34.123 * *
DENTRO DE GRUPOS	21.529924	54	.398702	
Total	62.344828	57		

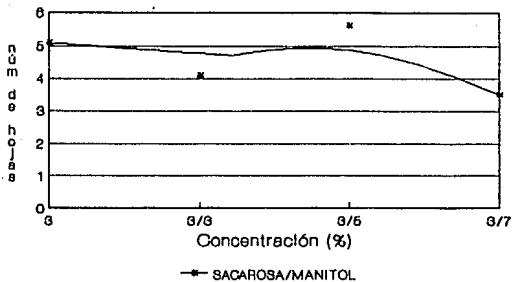
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALATAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
			1 2 3
7	16	3.5625000	*
3	15	4.0666667	*
0	11	5.0909091	*
5	16	5.6250000	*

Gráf. 16. Número de hojas formadas en ápices de ajo, en fase Ao, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 13 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 4 C y oscuridad.

TABLA 37. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN AO PARA EL NUMERO DE RAICES, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	11	1.000	1.673	0.505	167.3
2	3	3	15	0.400	0.910	0.235	227.5
3	3	5	16	3.188	3.351	0.838	105.1
4	3	7	16	3.375	2.705	0.676	80.1

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad	g.l.	Media de cuad.	F
ENTRE GRUPOS	101.59181	3	33.863937	5.754 * *
DENTRO DE GRUPOS	317.78750	54	5.884954	
Total	419.37931	57		

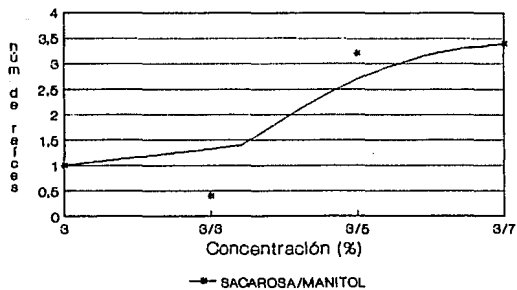
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALATAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
			1 2
2	15	.4000000	*
1	11	1.0000000	* *
3	16	3.1875000	*
4	16	3.3750000	*

Gráf. 17. Número de raíces formadas en ápices de ajo, en fase A₀, bajo el efecto de sacarosa y manitol al término de 13 meses de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación : 4 C y oscuridad.

TABLA 38. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN AO, PARA LA LONGITUD DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	11	0.836	0.121	0.036	14.3
2	3	3	15	1.300	0.906	0.234	69.6
3	3	5	16	1.806	0.783	0.196	43.3
4	3	7	16	3.457	1.300	0.325	37.5

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de Cuad.	g.l.	Media de Cuad	F
Entre grupos	56.610106	3	18.870035	22.078 **
Dentro de grupos	46.154205	54	.854707	
Total	102.76431	57		

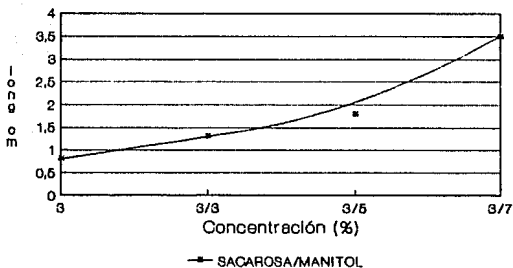
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM.	SAC(%)	MAN(%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
1	3	0	11	.8363636	1 2 3
2	3	3	15	1.3000000	* *
3	3	5	16	1.8062500	*
4	3	7	16	3.4562500	*

Gráf. 16. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de hojas nuevas en ápices de ajo, en Ao, in vitro en medio para recuperación.*



Condiciones de Incubación : 28 C,
2 000 lux y fotoperiodo de 18 hra.
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 15 días

TABLA 39. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN AO, PARA EL NUMERO DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	11	0.182	0.405	0.122	223.2
2	3	3	15	1.600	1.183	0.306	73.9
3	3	5	16	0.438	0.814	0.203	186.0
4	3	7	16	2.250	1.000	0.250	44.4

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad	g.l.	Media de cuad	F
Entre grupos	40.739929	3	13.579976	15.882 * *
Dentro de grupos	46.173864	54	.855072	
Total	86.913793	57		

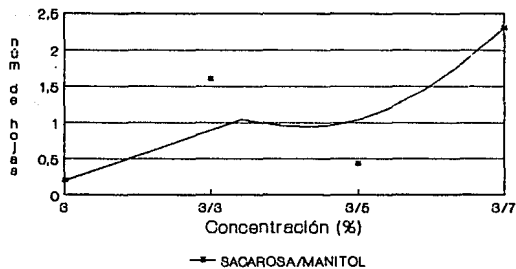
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
					1 2
1	3	0	11	.1818182	*
3	3	5	16	.4375000	*
2	3	3	15	1.6000000	*
4	3	7	16	2.2500000	*

Gráf. 19. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de hojas nuevas en ápices de ajo in vitro, en Ao en medio de recuperación.*



Condiciones de incubación : 28 C,
 2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.
 * 1/2MS +3% de sacarosa, durante 15 días

TABLA 40. EFECTO DE LA SACAROSA Y MANITOL EN LA RECUPERACION DE APICES DE AJO EN AO, PARA EL NUMERO DE RAICES, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	D.E.	E.E.	C.V. (%)
1	3	0	11	0.091	0.302	0.091	334.4
2	3	3	15	0.467	0.743	0.192	159.4
3	3	5	16	0.125	0.342	0.085	272.8
4	3	7	16	1.250	1.438	0.359	114.9

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad.	g.l.	Media de cuad	F
Entre grupos	13.090334	3	4.3634448	5.692 **
Dentro de grupos	41.392424	54	.7665264	
Total	54.482759	57		

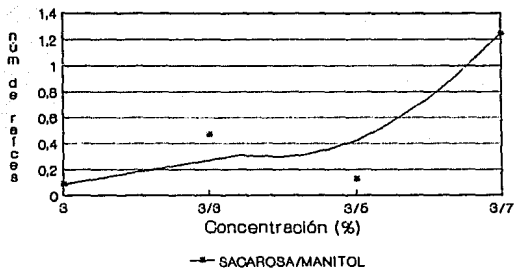
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

1 DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM	SAC (%)	MAN (%)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
1	3	0	11	.0909091	1 2 *
3	3	5	16	.1250000	*
2	3	3	15	.4666667	* *
4	3	7	16	1.2500000	*

Gráf. 20. Efecto de sacarosa y manitol en la formación de raíces nuevas de ápices de ajo in vitro, en Ao, en medio para recuperación.*



Condiciones de incubación : 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.
* 1/2MS +3% de sacarosa, durante 15 días

TABLA 41. Velocidades de crecimiento de los ápices de ajo *A. sativum* en la fase fisiológica Ao, sometidos a diferentes concentraciones de sacarosa y manitol, a 4°C y oscuridad, incubados durante 13 meses.

Ao			
No. Tratam.	F I cm/mes	F II cm/mes	FII - FI cm/mes
1	0.8	1.7	0.9
2	0.5	2.6	2.1
3	0.4	3.6	3.2
4	0.3	7.0	6.7

TABLA 42 . EFECTO DEL PIQUEROL A EN A2 PARA LA LONGITUD DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

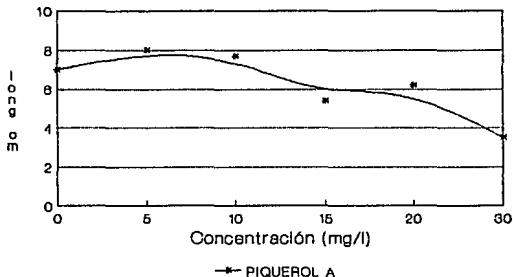
TRATAM	Piq A (mg/l)	n	MEDIAS	D.E.	E.E	C.V. (%)
1	0	11	7.000	4.786	1.443	68.3
2	5	13	7.992	2.436	0.676	30.4
3	10	11	7.727	4.196	1.265	54.2
4	15	11	5.418	4.644	1.400	85.6
5	20	16	6.163	3.833	0.958	62.1
7	30	10	3.460	3.451	1.091	99.7

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad.	g.l.	Media de cuad.	F
Entre grupos	154.1798	5	30.835967	1.996 +
Dentro de grupos	1019.4889	66	15.446802	
Total	1173.6687	71		

- * DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %
- * * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %
- + DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS AL 10 %

Gráf. 21. Longitud de hojas de ápices de ajo en fase A2 bajo el efecto de piquerol A, al término de 1 mes de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 28 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 18 hrs.

TABLA 43. EFECTO DEL PIQUEROL A EN A2 PARA EL NUMERO DE HOJAS, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM	Piq A	n	MEDIAS	D.E.	E.E	C.V.
	(mg/l)					(%)
1	0	11	4.545	2.979	0.898	65.5
2	5	13	5.846	1.345	0.373	22.9
3	10	11	4.909	2.166	0.653	44.1
4	15	11	3.182	1.991	0.600	62.5
5	20	16	4.688	1.702	0.425	36.2
7	30	10	3.600	1.776	0.562	49.3

ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad.	g.l.	Media de cuad.	F
Entre grupos	53.14191	5	10.628382	2.610 *
Dentro de grupos	268.80253	66	4.072766	
Total	321.94444	71		

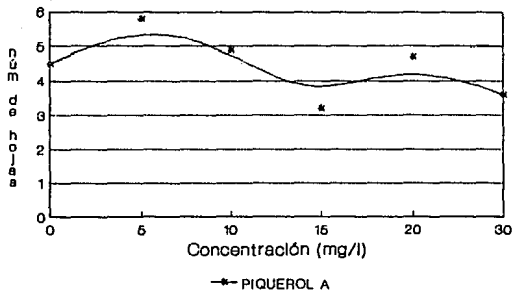
* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

* * DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

PRUEBA DE TUKEY

TRATAM	Piq A (mg/l)	n	MEDIAS	GRUPOS HOMOGENEOS
4	15	11	3.1818182	*
7	30	10	3.6000000	**
1	0	11	4.5454545	**
5	20	16	4.6875000	**
3	10	11	4.9090909	**
2	5	13	5.8461538	*

Gráf. 22. Número de hojas formadas en ápices de ojo en fase A2, bajo el efecto de piquerol A, al término de 1 mes de tratamiento in vitro.*



* Condiciones de incubación: 26 C,
2 000 lux y fotoperíodo de 16 hrs.

TABLA 44 . EFECTO DEL PIQUEROL A EN A2 PARA EL NUMERO DE RAICES, ANALISIS DE LA VARIANZA Y PRUEBA DE TUKEY.

TRATAM.	n	MEDIAS	D.E.	E.E	C.V. (%)
1	11	13.000	9.706	2.926	74.5
2	13	11.307	7.052	1.956	62.3
3	11	6.727	8.308	2.505	123.5
4	11	11.818	12.489	3.765	105.6
5	16	15.562	10.270	2.567	65.9
7	10	11.300	8.920	2.821	78.9

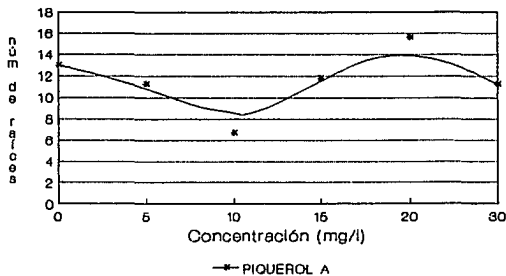
ANALISIS DE VARIANZA

Variación	Suma de cuad.	g.l.	Media de cuad.	F
Entre grupos	530.4862	5	106.09724	1.150
Dentro de grupos	6086.6249	66	92.22159	
Total	6617.1111	71		

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA AL 5 %

** DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA AL 1 %

Gráf. 23. Número de raíces formadas en ápices de ajo en fase A2, bajo el efecto de piquerol A, al término de 1 mes de tratamiento in vitro.



* Condiciones de incubación: 28 C.
2 000 lux y fotoperíodo de 18 hrs.

BIBLIOGRAFIA

- BAILEY, L. H., 1977. Manual of cultivated plants. Mc Millan. Eleventh Printing. Toronto, Ontario. pp245-246.
- BLANCO A. 1985. El problema del germoplasma en el mundo. *In: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. Compiladores: Manuel L. Robert y Victor Manuel Loyola. CICY-CONACYT. México. pp 27-34.
- BHOJWANI S.S. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Scientia Horticulturae* 13: 47-52.
- BREWSTER J. L. 1977. The physiology of the onion. *Horticultural abstracts*. 47 (1): 17-23; 103-112.
- CAMPOS ARIAS M. P., 1989. Estudios químicos del trinervinal. Tesis de Licenciatura. Química. Facultad de Química. U.N.A.M., México, D. F.
- CRONQUIST, A., 1981. An Integrated System of classification of Flowering Plants. Columbia University Press. New York. pp 1208- 1211.
- EL-GIZAWY, A. M. 1987. An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm. *Plant Cell, Tissue and organ culture* 9: 147-150.
- EVANS P. K. y E.C. Cocking. 1973. Isolated plant protoplasts. *In: Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. Street H.E. Blackwell Scientific Publications. London. pp 103-135.
- EVANS D. A., W. R. Sharp and J. E. Bravo. 1984. Cell Culture methods for Crop Improvement *In: Handbook of plant cell culture*. Vol. 2. Crop Species (Eds. W. R. Sharp, D.A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada). Macmillan Publishing. New York. pp. 47 - 68.
- FONT-QUER P. Plantas medicinales. Ed. Labor. Sexta edición. Barcelona pp. 887-890
- GAMBORG O. L., T. Murashige, T.A. Thorpe e I. K. Vasil. 1976. Plant Tissue Culture Media. *In Vitro*. 12:473-478.
- GEORGE, E. F. and P.D. Sherrington, 1984. Plant propagation by tissue culture handbook and directory of commercial laboratories. Ed. Exegetics Limited. Gran Bretaña. pp

- GONZALEZ DE LA PARRA, A.L. Anaya, F. Espinoza, M. Jimenez y R. Castillo. 1981. Allelopathic Potential of *Piqueria trinervia* (Compositae) and piqueral A and B. *Journal of Chemical Ecology*. 7(3): 509-515.
- HARTMANN H. T. y D. E. Kestler. 1982. Propagación de plantas, principios y practicas. CECOSA. Mexico.
- HAWKES J.G. 1980. Genetic conservation of "recalcitrant species- An overview. En: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material. Proceedings of an International workshop held at the University of Reading U. K. Ed. L. A. Withers y J.T. Williams pp 83-92.
- HENSHAW G. G., J. A. Stamo y R. J. Wescott. 1980 a. Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germplasm. *In: Tissue Culture methods for plant pathologists*. Ed. Ingram D.S. & Helgeson J.P. pp 71-76
- HENSHAW G.G., J.A. Stamo y R.J. Wescott. 1980 b. Tissue Cultures and germplasm storage. *In: Plant cell cultures: Results and perspectives* Editors F. Sala B. Parisi, R. Cella and G. Ciferri, Elsevier/Nort-Holland Biomedical Press.
- HOMER C. T. 1939. Vegetable crops. Third edition. Mc Graw Hill Book Company. Inc. New York. pp. 327-350.
- HORNEDO G. A., 1987. El ajo, algo más que cabeza y dientes. *Síntesis Hortícola*, 7:1 19-20
- HÜSEMANN W. and W. Barz. 1977. Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiol. plant* 40, 77-81.
- HUSSEY G. 1982. *In vitro* propagation of monocotyledonous bulbs and corms. En: Proc. 5th International Congress. Plant Tissue & Cell Culture. Ed. A. Fujiwara, Japanese Assoc. of Plant Tissue Culture. Tokio pp 677-680.
- IBPGR. 1976. Report of IBPGR Working Group on Engineering. Design and Cost Aspects of Long-Term Seed Storage Facilities. International Board for Plant Genetic Resources Rome.
- IBPGR. 1986 a. Designe, Planning and Operation of *in vitro* Genebanks International Board for Plant Genetic Resources. Rome.
- IBPGR. 1986 b. Report of IBPGR Advisory Committee on *in vitro* storage. International Board for Plant Genetic Resources. Rome.

- IBRAHIM R. K. 1978. Regulation of synthesis of phenolics. En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants. Ed. Constabell F. and I. K. Vasil. Academic Press. U.S.A. pp. 81-82.
- KARTHA K.K., N. L. Leung and O. L. Gamborg. 1979. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. Plant Science Letters. 15: 7-15.
- KARTHA K.K., N.L. Leung y K.Pahl. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets Journal American Society Hort Science. 105(4): 481-484.
- KARTHA K.K., L. A. Mroginski, K. Pahl and N. L. Leung. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Science Letters, 22: 301-307.
- KARTHA K.K., N.L. Lejung y L. A. Mroginski. 1982. *In vitro* growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) überreicht von Verfasser.
- KEHR, A. F. and G. W. Schaeffer. 1976. Tissue culture differentiation of garlic. Hort Science. 11(4): 422-423.
- KOUL A. K., R. N. Gohil and A. Langer. 1979. Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding systems. Euphytica 28: 457-464.
- LABORDE J. A., 1988. Pudrición Blanca en el Bajío. Síntesis Hortícola, 10: 2, 12-19.
- LEVITT J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. 1. Chilling, freezing and high temperature stresses. Academic Press. U. S. A. pp 10-24; 67-68.
- LIESELOTTE S., N. Espinoza, R. Estrada and R. Lizarraga. 1982. *In vitro* storage and distribution of potato germplasm In: Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture pp.
- LOPEZ D. H.A. Efecto del ácido acetil salicílico en el crecimiento de yemas de *Solanum cardiophyllum* (Lindl.) cultivados *in vitro*. Colegio de Posgraduados. 1987. Tesis de Maestría.

- MERYMAN H. T. Y R. J. WILLIAMS. Mechanisms of freezing injury and natural tolerance and the principles of artificial cryoprotection En: workshop. En: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material. Proceedings of an International workshop held at the University of Reading U. K. Ed. L. A. Winters y J.T. Williams. pp.5-37 .
- MESSIAEN C. 1974. Physiologie de l'aïl. Comote rendu de Journées Nationales del'aïl Organisees par le GNIS a Bermont de Lomagne. Mai pp. 7-10.
- MURASHIGE T. and F. Skoog. 1961. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plan.* 15: 473-494
- MURASHIGE T., 1974. Plant propagation Throught Tissue Culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135 - 166.
- NOME F., A. Abril y R. Racca. 1981. Obtencion de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales. *Phyton.* 41: 139-151.
- NOVAK F. J., 1974. The changes of karyotype in callus culture of *Allium sativum* L. *Caryologia.* 27: 45-54.
- NOVAK F. J., 1981. Chromosomal Characteristics of long-term Callus Cultures of *Allium sativum* L. *Cytologia* 46:371-379.
- NOVAK, F. J., L. Havel y J. Dolezel. *Allium.* 1986 En: Handbook plant cell culture Vol. 4. Techniques and applications, p. 419-456. Editado por D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato. Editorial Macmillan Publishing Company, N. Y., 1986.
- NWANKWO B. A. and A.D. Krikorian. 1982. Water as a storage medium for *Eleais guineensis* (pisifera) seeds under aseptic conditions. *Annals of Botany,* 50: 793 - 798.
- PARAL L. 1953. Los compuestos del Valle Central de México. *Bol. Sac. Bot. Mex.* 15: 1-12
- PRITCHARD H. W., B. W. W. Grout, D. S. Reid and K. C. Short. 1982. The effects of growth under water stress on the structure metabolism and cryopreservation of cultured sycamore cells. In: *The Biophysics of water* (eds. Franks. F and Manthias S.). John Wiley and Sons Ltd. New York. pp. 315 - 318.
- PLUCNETT, D. L., N. J. H. Smith, J. T. Williams and N. M. Anisheetty. 1983. Crop Germplasm Conservation and Developing Countries. *Science,* 220: 163 - 169.

- QUAK F., 1977. Meristem culture and virus-free plants. *In: Applied and Fundamental Aspects of plant cell, Tissue and organ Culture.* (Eds.) Reinert and Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin. pp. 598-615.
- ROBERTS E. H. and M.W. King. Storage of recalcitrant seeds. *In: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material.* Edited by Withers L. A. y J. T. Williams Gran Bretaña, 1980.
- ROBERTS E. H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology.* 1, 499-514.
- ROCA W. M., M. Hidalgo y G. Alvarez. Genetic resources unit. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali Colombia. 1983: pp. 29-39.
- RODRIGUEZ-GARAY B. and J. R. Barrow. 1986. Short term storage of cotton pollen. *Plant and Reports.* pp. 332-333.
- ROMO J., A. Romo de Vivar, L. Quijano, Tirso Rios y E. Días. 1970. Los componentes terpenoides de la *Piqueria trinervis* Cav. *Rev Latinoam. de Química.* 1:72-81.
- RUBIO M. Annik Vivier Bunge y M. Jiménez. Estructura electrónica de piqueral A y piqueral B. *Rev. Latinoamericana de Química.* 16/2: 69-72.
- RUBLUO A. y K.K. Kartha. 1985 a. *In vitro* culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars. *Journal of Plant Physiology.* 119: 425-433.
- RUBLUO A. Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal *in vitro.* 1985 b. *In: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México.* Compiladores: Manuel L. Robert y Victor Manuel Loyola. CICY-CONACYT. 1985b. Mexico. pp 35-53.
- SAKUTA M. and A. Komamine. 1987. Cell Growth and Accumulation of Secondary Metabolites. *In: Cell Culture and Somatic Cell genetics of plants.* (Eds.) Vasil, I. K. and F. Constabel. Academic Press. New York. pp 97-114.
- SALISBURY F. B. Y C. W. Ross. 1978. *Plant Physiology.* Wadsworth Publishing Company. Inc. California. 1978. pp 324.
- SIMMONDS N. W. 1980. Genetic conservation: the context of workshop. *In: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material.* Proceedings of an International workshop held at the University of Reading U. K. Ed. L. A. Withers y J.T. Williams. pp. 1-3.

- SORIANO-GARCIA M., M. Jimenez, m. González, A. Hernandez, M. Schatz y C. Campana. 1983. Crystal and molecular structure of Piqueral A a potent growth-inhibitory factor. Chemistry Letters. 617-620.
- STARITSKY G. 1980. Growth inhibition and dormancy. *In: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material. Proceedings of an International workshop held at the University of Reading U. K. Ed. L. A. Withers y J.T. Williams.* pp. 109-113.
- TAL. M. 1983. Selection for stress tolerance. *In: Handbook of plante cell culture, Vol. I. Techniques for propagation and breeding . Ed. David A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada. Mac Millan Publishing Company. New York. pp 461-488.*
- THORPE T.A. Physiological and Biochemical aspects of organogenesis in vitro. *En Frontiers of plant Tissue Culture. Edited by Trevor A.Thorpe. International Association for plant Tissue Culture. 1978. pp 49-58 .*
- TRIP P., G. Kratkov y C.D. Nelson. 1964. Metabolism of mannitol in higher plants. *American Journal of Botany* 51 (8): 828-835.
- WILLIAMS J.T. y L.A. Withers. 1980. Foreword. *En: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult Material. Proceedings of an International workshop held at the University of Reading U. K. Ed. L.A. Withers y J.T. Williams* pp. XIII-XIV.
- WILSON E. O. 1988. The current state of biological diversity. *En: Biodiversity. National Academy Press. pp.3 - 27.*
- WITHERS L.A. 1980. Storage of plant tissue culture. *En: Crop Genetic Resources the Conservation of Difficult material. Proceedings of an International workshop held at the University of Reading U.k. Ed. L.A. Withers y J.T. Williams* pp. 49-82.
- YEDMAN M. M., 1984. Plant Cell Culture Technology Botanical Monographs. Vol. 23. Ed. Blackwell Scientific Publications London. pp 115.

APENDICE I. MEDIO MS A LA MITAD DE CONCENTRACION DE SALES .
 Para preparar un litro de medio de cultivo.

SOLUCIONES MADRE	REACTIVOS	CONCENTRACION (mg/l)
MACRONUTRIMENTOS		
	NH ₄ NO ₃	825
	KNO ₃	800
	MgSO ₄ 4H ₂ O	185
	KH ₂ PO ₄	85
	CaCl ₂ 2H ₂ O	220
MICRONUTRIMENTOS		
	KI	0.83
	H ₃ BO ₃	6.2
	MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.3
	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
SOLUCION DE FeCON EDTA		
	Na ₂ EDTA	37.3
	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
SOLUCION DE INOSITOL		
	Inositol	100.0
VITAMINAS		
	Acida Nicotinica	5.0
	Piridoxina HCl	1.0
	Tiamina	0.5
SOLUCION DE GLICINA		
	Glicina	2.0
	pH= 5.7 -5.8	