



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Regeneración de cultivos embriogénicos de cuatro variedades
de ajo (*Allium sativum* L.) y obtención de protoplastos.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

LUIS GERARDO GUTIÉRREZ VARGAS

DIRECTORA DE TESIS:
ING. Ma. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

Ciudad de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Hoja de datos del jurado.

1. Datos del alumno

Gutiérrez
Vargas
Luis Gerardo
01(55) 26067077
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Biología
410082904

2. Datos del tutor

Ing.
Olivera
Flores
Teresa de Jesús

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Rosas
Acevedo
Hortensia

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Luna
Rosales
Bárbara Susana

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Orozco
Almanza
María Socorro

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Romero
Arredondo
Juan

7. Datos del trabajo escrito

Regeneración de cultivos embriogénicos de cuatro variedades de ajo (*Allium sativum* L.) y obtención de protoplastos.
83 p.
2017



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 "ZARAGOZA"
 DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 PRESENTE.**

Comunico a usted que el alumno **GUTIÉRREZ VARGAS LUIS GERARDO**, con número de cuenta **410082904**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **26 de septiembre 2017 a las 13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. **BÁRBARA SUSANA LUNA ROSA** FS

VOCAL Ing. **MARÍA TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES***

SECRETARIO Dra. **HORTENSIA ROSAS ACEVEDO**

SUPLENTE Dra. **MARÍA SOCORRO OROZCO ALMANZA**

SUPLENTE Biól. **JUAN ROMERO ARREDONDO**

El título de la tesis que presenta es: **Regeneración de cultivos embriogénicos de cuatro variedades de ajo (*Allium sativum* L.) y obtención de protoplastos.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Ciudad de México, a 26 de julio de 2017

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR

DE NOTAS
 SUPERIORES

 ZARAGOZA
 DIRECCIÓN

RECIBI
 OFICINA DE EXÁMENES
 PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
 M. en C. **ARMANDO CERVANTES SANDOVAL**
 JEFE DE CARRERA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional de la alumna:

GUTIÉRREZ VARGAS LUIS GERARDO

Quien presenta como trabajo recepcional: **Regeneración de cultivos embriogénicos de cuatro variedades de ajo (*Allium sativum* L.) y obtención de protoplastos.**

PRESIDENTE M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES

VOCAL Ing. MARÍA ILICSA DE JESÚS OLIVERA FLORES*

SECRETARIO Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO

SUPLENTE Dra. MARÍA SOCORRO OROZCO ALMANZA

SUPLENTE BIÓL. JUAN ROMERO ARREDONDO

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarlos.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Ciudad de México, a 27 de abril de 2017.

M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE LA CARRERA



c.c.p. Departamento de Control de Escuelas
c.c.p. Secretaría Técnica de la Carrera
c.c.p. Interesado

“Somos huellas en la arena torturadas por el océano del tiempo”

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Nacional Autónoma de México, una de las mejores universidades del mundo, donde tuve el privilegio de cursar la educación superior.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, sitio que para mí siempre será un oasis lleno de árboles con frutos exóticos y un sinfín de curiosos animales.

A la Facultad de Química y en particular al laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Dpto. de Bioquímica, lugar donde me encontré con el mejor medio de cultivo.

A la Ing. María Teresa de Jesús Olivera Flores, por brindarme la oportunidad de formar parte de ese gran grupo de trabajo, alentarme a seguir en los momentos más difíciles de esta etapa y apoyarme más allá de lo académico, por ser un ejemplo de vida y una amiga. Gracias MyT.

Al M. en C. Amadeo Barba Álvarez y a la M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales por iniciarme en el Cultivo de Tejidos Vegetales con su receta de interesantes clases, aderezadas con fantásticas salidas a campo.

A los integrantes del jurado: Dra. Hortensia Rosas Acevedo, M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, Dra. María Socorro Orozco Almanza y al Biól. Juan Romero Arredondo por el tiempo que me brindaron, sus valiosos comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A la M. en D. Araceli Arandal Martínez por su gran apoyo a lo largo de este proyecto.

A mi camada con la que compartí grandes momentos en esta etapa de mi vida: Fredy, Arita, Claudia, Sara, Naye, Gary, Úrsula, Cris, Vero, Víctor, Diana, Karla, Abish, Eli, Jorge, Félix y Harold.

A mis amigos de la Facultad con quienes he vivido grandes aventuras: Anayeli, Alejandra, Bere y Lalo.

Finalmente quiero agradecer a Laritza por haber sido parte de mi familia durante este proceso.

Dedicatoria

A mi madre María del Rocío Vargas Palafox por creer en mí y siempre apoyarme en las decisiones que tomo, por ser el combustible que me impulsa a llegar más lejos y a ser una mejor persona. Con mucho amor te dedico este trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. Marco teórico.....	5
2.1 Generalidades de <i>Allium sativum</i> L.....	5
2.1.1 Centro de origen y distribución geográfica	5
2.1.2 Clasificación Taxonómica	5
2.1.3 Descripción botánica	6
2.1.4 Variedades.....	8
2.2 El cultivo del ajo.....	9
2.2.1 Usos del ajo.....	10
2.2.2 Importancia económica	10
2.2.3 Principales problemas fitosanitarios	12
2.2.4 Mejoramiento genético	13
2.3 El cultivo de tejidos vegetales.....	14
2.3.1 Factores importantes en el cultivo de tejidos vegetales	15
2.3.1.1 Explante.....	15
2.3.1.2 Medio de Cultivo.....	16
2.3.1.2.1 Fuentes de Nitrógeno	16
2.3.1.3 Condiciones de incubación	17
2.3.2 Vías regenerativas	18
2.3.2.1 Organogénesis	19
2.3.2.2 Embriogénesis somática.....	20

2.3.3	Caracterización de los cultivos <i>in vitro</i>	21
2.3.4	Cultivo de protoplastos	23
2.4	Cultivo de tejidos en <i>Allium sativum</i>	25
III.	Justificación	28
IV.	Objetivos	29
4.1	Objetivo general	29
4.2	Objetivos particulares	29
V.	Material y método.....	30
5.1	Diagrama experimental o ruta critica	30
5.2	Material biológico.....	31
5.3	Aspectos generales	31
5.3.1	Preparación de medio de cultivo	31
5.3.2	Métodos de desinfección.....	34
5.3.3	Condiciones de incubación y subcultivo	35
5.4	Ensayos sobre la inducción y proliferación de callos embriogénicos	35
5.5	Obtención de suspensión celular	36
5.6	Ensayos sobre la obtención de protoplastos	37
5.7	Ensayos sobre la regeneración de plántulas	38
VI.	Resultados y discusión.....	39
6.1	Ensayos sobre la inducción y proliferación de callos embriogénicos	39
6.2	Ensayos sobre la obtención de protoplastos	54
6.3	Ensayos sobre la regeneración de plántulas y desarrollo de bulbos	57
6.3.1	Regeneración de plántulas.....	57
6.3.2	Desarrollo de plántulas y formación de bulbos.....	65
VII.	Conclusiones.....	69
VIII.	Bibliografía.....	71
	ANEXOS.....	80
	ANEXO 1. Composición de la formulación de sales Murashige y Skoog (1962).	80
	ANEXO 2. Soluciones concentradas MS (Murashigue & Skoog, 1962).	81
	ANEXO 3. Vitaminas	82
	Vitaminas R2	82
	Coctel 20.....	83
	ANEXO 4. Solución antioxidante	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción de las estructuras vegetales del ajo (<i>A. sativum</i> L.).....	7
Figura 2. Incremento mundial en la producción de ajo (<i>A. sativum</i> L.) desde el año de 1980.....	10
Figura 3. Comparación de los 5 principales países productores de Ajo para el año 2013.....	11
Figura 4. Ajo contaminado con podredumbre blanca, <i>S. cepivorum</i>	12
Figura 5. <i>Ditylencus dipsaci</i>	13
Figura 6. Vías regenerativas de la morfogénesis.....	18
Figura 7. Morfogénesis directa con origen unicelular.....	19
Figura 8. Semejanza en el desarrollo de embriones cigóticos.....	21
Figura 9. Diagrama de una cinética de crecimiento típica.....	22
Figura 10. Protoplastos de mesófilo de <i>Nicotiana tabacum</i> L.....	23
Figura 11. Ruta crítica para la inducción y proliferación de callo embriogénico de cuatro variedades de ajo (<i>A. sativum</i> L.), regeneración de embriones somáticos y obtención de protoplastos.....	30
Figura 12. Protocolo de desinfección modificado.....	34
Figura 13. Estructura de bulbo individual en la cual se observa el disco basal.....	35
Figura 14. Contaminación del material vegetal.....	39
Figura 15. Disco basal con desarrollo de brotes.....	44
Figura 16. Disco basal.....	45
Figura 17. Fase de inducción de callo de ajo, var. Blanca.....	45
Figura 18. Fase de inducción de callo.....	48
Figura 19. Medición de peso fresco de callo de las variedades Blanca, Morada, Chilena y Jaspeada.....	50
Figura 20. Cinética de crecimiento en la cual se muestran las fases del crecimiento celular de las variedades Blanca (a), Morada (b), Chilena (c) y Jaspeada (d).....	53
Figura 21. Protoplastos aislados de ajos, var. Blanca.....	55
Figura 22. Fase de regeneración en var. Blanca con el medio R-1.....	58
Figura 23. Maduración de embriones somáticos en callos de ajo, var. Blanca con el medio R-2.....	60
Figura 24. Fase de regeneración en var. Blanca con el medio R-3.....	61
Figura 25. Etapa I de desarrollo del bulbo de ajo, var. Blanca en el medio R-2.....	66
Figura 26. Etapa II de desarrollo del bulbo de ajo, var. Blanca en el medio R-2.....	67
Figura 27. Etapa II de desarrollo del bulbo de ajo, var. Blanca en el medio R-2.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del ajo (<i>Allium sativum</i> L.).....	6
Cuadro 2. Trabajos previos en la regeneración de ajo (<i>A. sativum</i> L.).....	25
Cuadro 3. Medios de cultivo para la etapa de inducción, proliferación y regeneración en cultivo de disco basal de ajo (<i>A. sativum</i> L.).....	32
Cuadro 4. Componentes del medio de cultivo CPW	33
Cuadro 5. Medio de cultivo CPW13M, CPW21S y CPW	33
Cuadro 6. Concentraciones enzimáticas	37
Cuadro 7. Protocolos de desinfección	40
Cuadro 8. Agroquímicos.....	41
Cuadro 9. Eficiencia del establecimiento	43
Cuadro 10. Protoplastos obtenidos en los tratamientos enzimáticos	54
Cuadro 11. Protoplastos obtenidos con diferentes tiempos de incubación	56
Cuadro 12. Regeneración de plántulas en la variedad Blanca	58
Cuadro 13. Proporción nitrato/amonio en los medios de regeneración en la variedad Blanca.	62
Cuadro 14. Plántulas generadas en cuatro variedades de ajo*	63
Cuadro 15. Composición de la formulación de sales MS (1962)	80
Cuadro 16. Soluciones concentradas (100X) del medio conocido como MS (1962)	81
Cuadro 17. Formulaciones vitamínicas.....	82
Cuadro 18. Vitaminas R2	82

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2ip	2-isopenteniladenina
AIA	Ácido indo-3-acético
ANA	Ácido α -naftalenacético
B5	Gamborg <i>et al.</i> , (1968)
BAP	6-benzilaminopurina
CH	Caseína hidrolizada
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
es	Embriones somáticos
eg	Estructuras globulares
H	Heller (1953)
I-A	Medio de inducción y proliferación A
I-B	Medio de inducción y proliferación B
I-C	Medio de inducción y proliferación C
KIN	Kinetina, N6-furfuriladenina
MS	Murashige & Skoog (1962)
Macro	Macronutrientes
Micro	Micronutrientes
N6	Chu <i>et al.</i> , (1975)
pc	Residuos de pared celular
Picloran	Ácido 4-Aminotricloropicolínico

pp	Pérdida de pigmentación
pr	Protoplastos
ps	Estructura similar a suspensor
P-I	Medio para obtención de protoplastos 1
P-II	Medio para obtención de protoplastos 2
P-III	Medio para obtención de protoplastos 3
P-IV	Medio para obtención de protoplastos 4
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
R-1	Medio de regeneración 1
R-2	Medio de regeneración 2
R-3	Medio de regeneración 3
sd	Células sin digerir
Vit	Vitaminas

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie de gran importancia, cultivada alrededor del mundo por su uso culinario y por sus propiedades medicinales. El ajo es una planta anual, de reproducción vegetativa. Aunque se han identificado variedades fértiles, los bajos porcentajes de germinación de las semillas y las plántulas de bajo vigor, hacen que el ajo se haya definido como una especie agámica, es decir, únicamente se reproduce asexualmente. Este tipo de reproducción provoca el acarreo de enfermedades de una cosecha a otra, dando como resultado un debilitamiento progresivo de las variedades, disminuyendo tanto la calidad como el rendimiento de los cultivos.

Siendo el ajo un cultivo de tanta importancia y con creciente demanda a nivel mundial, se ha apostado por las herramientas biotecnológicas para resolver la problemática. En este sentido, este estudio buscó un primer acercamiento para futuros trabajos en la fusión de protoplastos de ajo, estableciendo las condiciones enzimáticas, así como el tiempo de exposición para la obtención de protoplastos en la variedad Blanca de ajo. Además, se buscó la obtención de un protocolo para la inducción y proliferación de callo embriogénico, y la regeneración de plantas de las variedades Blanca, Morada, Chilena y Jaspeada.

La inducción se logró en el medio I-A, el cual contenía $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, además de aportar una gran cantidad de aminoácidos. Para la proliferación se empleó el medio I-A, observándose diferentes tendencias entre las variedades, siendo mayor la proliferación en la variedad Blanca. La mejor respuesta en la regeneración se observó en el medio R-2 con la mayor producción de plántulas. Así mismo, la variedad Chilena fue la que regeneró la mayor cantidad de plántulas a razón de 29.2 por gramo de callo. Por lo cual es posible afirmar que bajo las condiciones establecidas en el presente estudio, es posible obtener callo con características embriogénicas de las variedades Blanca, Morada, Chilena y Jaspeada, además de ser posible la regeneración de plantas libres de patógenos. Finalmente, Se consiguió la mayor cantidad de protoplastos con la

combinación de celulasa onozuko R10 (2%) y macerocima R10 (0.5%) del tratamiento P-III, y con 16 horas de exposición a la solución enzimática, obteniéndose 4500 protoplastos por gramo de células en suspensión.

I. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial y figura entre las plantas que más tiempo han acompañado a la historia de la humanidad. En la actualidad, es cultivado alrededor del mundo por su uso culinario y por sus propiedades medicinales. El ajo es un ingrediente fundamental en diversos platillos, particularmente en la cocina mediterránea y oriental. Por otro lado, se ha demostrado que el consumo de ajo puede reducir el factor de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Así mismo, diferentes estudios coinciden que el consumo de ajo puede prevenir la aparición de distintos tipos de cáncer (De la Cruz & García, 2007; Lim, 2015; Haider *et al.*, 2015).

Económicamente el cultivo del ajo es uno de los más relevantes y año con año aumenta la necesidad de áreas de cultivo para cubrir la demanda. En el año 2013 se destinaron 1, 437,690 hectáreas para el cultivo de ajo, lográndose una producción mundial cercana a los 25 millones de toneladas. El principal país productor es China, seguido por India, República de Corea, Egipto y Rusia. A pesar de que nuestro país no figura entre los principales países productores de ajo, destaca el papel de México como país exportador de este cultivo. La producción nacional se concentra en Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California y Sonora (Lagunes *et al.*, 2013; FAO, 2014).

El ajo es un importante cultivo con una gran capacidad de adaptación, es cultivado desde el nivel del mar hasta los 3,700 m. Su reproducción es enteramente vegetativa, ya que el ajo no produce semillas fértiles. Aunque se han identificado variedades fértiles, los bajos porcentajes de germinación de las semillas y las plántulas de bajo vigor, hacen que el ajo se haya definido como una especie agámica. Esta condición limita la variabilidad genética y favorece la transmisión de enfermedades, lo cual provoca un debilitamiento progresivo del cultivo (De la Cruz & García, 2007; Burba, 2009; Lim, 2015; Haider *et al.*, 2015).

Una alternativa para resolver esta problemática es el empleo del cultivo de tejidos vegetales (CTV), el cual engloba un conjunto de técnicas biotecnológicas con una gran variedad de aplicaciones, las cuales pueden ser integradas para su implementación en este cultivo. Primeramente, está el cultivo de meristemos, el cual tiene el objetivo de obtener plantas libres de patógenos. Una vez conseguidas plantas de calidad, el siguiente paso es la micropropagación, con ello se busca propagar masivamente la planta de interés en un intervalo corto de tiempo (Mroginski *et al.*, 2010).

La reproducción vegetativa del ajo hace a los programas de mejoramiento genéticos tradicionales una alternativa lenta y costosa. Con el CTV es posible implementar técnicas para lograr este objetivo en corto tiempo, entre ellas la biobalística, la transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* y el cultivo y fusión de protoplastos. En este contexto el objetivo del presente estudio fue obtener un protocolo para la inducción, proliferación y regeneración de callos embriogénicos de cuatro variedades ajo, así como tener un primer acercamiento a la fusión de protoplastos, estableciendo las condiciones enzimáticas para la obtención de protoplastos en la variedad Blanca de ajo, como un paso inicial para futuros trabajos enfocados en el mejoramiento genético de la especie.

II. Marco teórico

2.1 Generalidades de *Allium sativum* L.

El nombre romano del ajo es *Allium* y *sativum* proviene del latín y quiere decir cultivado. El ajo (*Allium sativum* L.) es uno de los cultivos más antiguos, formando parte de la historia del hombre desde épocas remotas. Es mencionado en manuscritos históricos de diversas culturas tales como la egipcia, babilónica, sumeria, griega, china e hindú. En la actualidad, el ajo ocupa el segundo lugar a nivel mundial en importancia dentro del género *Allium* y es cultivado alrededor del mundo, particularmente en lugares con clima templado (Acosta *et al.*, 2008; Lim, 2015).

2.1.1 Centro de origen y distribución geográfica

El ajo es originario de Asia central (Montañas Tian) de la región limítrofe entre Kazajistán, Kirguistán y la Región Autónoma Xinjiang Uyghur de China occidental, lugar endémico de su probable antecesor directo *Allium longicuspis* Regel. La dispersión del ajo estuvo ligada a las actividades del hombre en la región del mediterráneo, de donde fue traído al continente americano por los primeros colonizadores europeos (probablemente a través de México) hace 500 años. Hoy día, este cultivo tiene una distribución mundial y es cultivado principalmente en regiones de clima templado (Izquierdo & Quiones, 2001; Pérez *et al.*, 2005; Reveles *et al.*, 2009; Robledo & Villalobos, 2013; Lim, 2015).

2.1.2 Clasificación Taxonómica

El ajo (*A. sativum* L.) es una especie perteneciente al género *Allium*, al cual también pertenece la cebolla (*A. cepa* L.), el puerro (*A. ampeloprasum* L.) y los cebollinos (*A. fistulosum* L.). Existen más de 500 especies dentro de este género,

la mayor parte de ellas en estado silvestre y sin relevancia económica, todas ellas confinadas al hemisferio norte (Reveles *et al.*, 2009).

A continuación, se presenta su clasificación taxonómica (USDA, 2015a, b):

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del ajo (*Allium sativum* L.)

	Reino	<i>Plantae</i>
	División	<i>Magnoliophyta</i>
	Clase	<i>Liliopsida</i>
	Orden	<i>Asparagales</i>
	Familia	<i>Amaryllidaceae</i>
	Subfamilia	<i>Allioideae</i>
	Tribu	<i>Allieae</i>
	Género	<i>Allium</i>
	Especie	<i>Allium sativum</i> L.

Se conocen principalmente tres subespecies de ajo (también botánicamente variedades): *sativum*, *ophioscorodon* y *pekinense*. Los ecotipos más comunes de ajos “rosados”, “violetas”, “blancos” y “colorados” pertenecen a la variedad *sativum*, mientras que los ajos “morados”, mal llamados “chinos” pertenecen a la variedad *pekinense*. Por último, la variedad *ophioscorodon* abarca los ajos “castaños”, mal llamados “rusos” o “polacos” (Burba, 2009).

2.1.3 Descripción botánica

El ajo es una planta anual, de reproducción vegetativa que llega a medir de 30 a 60 cm de altura. Al finalizar su ciclo sólo permanecen con vida las yemas que forman los dientes, mediante las cuales se realiza su reproducción (bulbosa perenne). La parte principal de esta planta es “el bulbo compuesto”, el cual está conformado por un número variable de dientes o bulbillos, que van desde 6 hasta 20 en la mayoría de los casos, aunque se llegan a encontrar bulbos con 40 o más

dientes. Cada bulbo individual está cubierto por una túnica interior llamada catáfilo, mientras que el bulbo compuesto está envuelto por una membrana común (túnica) con una coloración que va del blanco al rojizo o púrpureo. Su sistema radical es de tipo barba, muy parecido al de la cebolla. Las raíces son adventicias y llegan a alcanzar una profundidad comprendida entre 5 a 45 cm, aunque pueden llegar hasta los 80 cm (Izqueirido & Quiones, 2001; Izquierdo, 2006; De la Cruz & García, 2007; Reveles *et al.*, 2009; Lim, 2015).

El tallo verdadero se ha reducido a un “disco basal” que mide alrededor de 30 mm de diámetro por 5 mm de altura, con forma de plato, del cual nacen tanto raíces como hojas y está ubicado en la base del bulbo (**Fig. 1**). Por otro lado, el pseudotallo está formado por las bases de revestimiento de las hojas, las cuales miden de 20 a 50 cm de longitud por 1 a 3 cm de ancho. Las hojas son alargadas, planas y envainadoras (Mujica *et al.*, 2008; Reveles *et al.*, 2009).

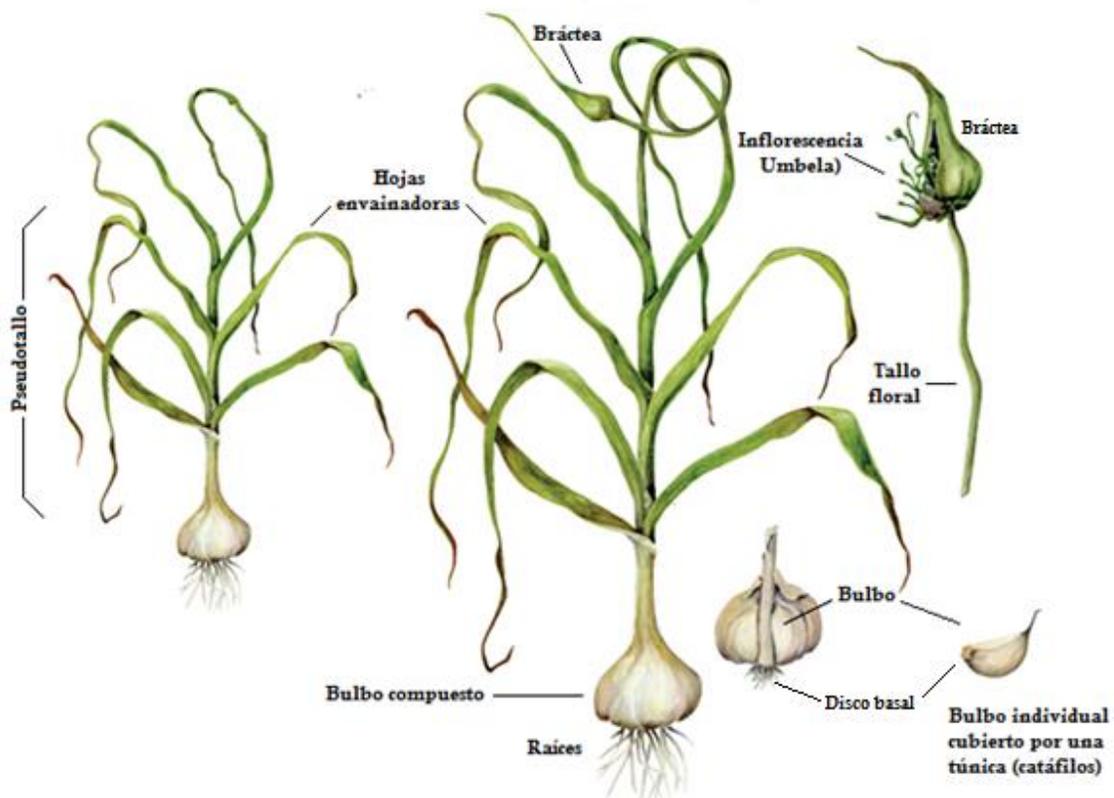


Figura 1. Descripción de las estructuras vegetales del ajo (*A. sativum* L.), modificada de Rader y McGuinness (2016).

Dependiendo de la variedad y condiciones climáticas puede formarse o no un tallo floral (variedades de “cuello duro” y “cuello blando”, respectivamente). Cuando se forma el tallo floral, en la parte superior aparece la inflorescencia en forma de umbela esferoidal. La inflorescencia está cubierta por una gran bráctea membranácea, ésta se abre longitudinalmente en el momento de la floración y permanece marchita debajo de las flores. La umbela está constituida por flores pequeñas, cada una con seis sépalos y seis pétalos de color blanco o rosado, así como seis estambres y un pistilo que al madurar da origen a un fruto con dos semillas (raramente se producen), las cuales no se emplean con fines reproductivos. Aunque se han identificado variedades fértiles, los bajos porcentajes de germinación de las semillas y las plántulas de bajo vigor, hacen que el ajo se haya definido como una especie agámica, es decir, únicamente se reproduce asexualmente. Es común el desarrollo de bulbillos en la parte superior de la inflorescencia (Reveles *et al.*, 2009; Robledo & Villalobos, 2013).

2.1.4 Variedades

Pese a la condición estrictamente agámica de la especie, el ajo tiene un amplio repertorio de variedades, se estima que existen cerca de 300 variedades cultivadas alrededor del mundo. El proceso por el cual se crea una variedad es lento, consiste en la metódica selección de ligeras variaciones (mutaciones espontáneas) de algún tipo comercial introducido en la región, tal es el caso de la variedad “Vikingo-1” y “Vikingo-2” derivadas de la variedad “Chilena”. Las variedades se pueden distinguir fenotípicamente a nivel de planta en altura, número y coloración de la hoja; y en sabor, número, peso, así como en el color y talla del bulbo (De la Cruz & García, 2007; Raggio & Mora, 2008).

Alrededor del mundo se reconocen ajos con diferentes características, los cuales son principalmente nombrados de acuerdo al color de los bulbos. Por ejemplo, están los ajos llamados blancos, los perla, jaspeados, rosa, rosados, rojos, violeta, morado o colorado. Es común que la denominación tienda a variar según la

apreciación, lo cual hace arbitraria cualquier denominación y compleja la clasificación de las variedades. En términos generales, es posible clasificar las variedades de ajo de manera artificial en dos grupos: 1) de cuello duro o con vara floral (*hardneck*) o; 2) de cuello blando o sin vara floral (*softneck*). Las variedades de ajo de cuello duro muestran un escapo sólido, alto emergiendo del centro del bulbo con flores que a menudo abortan y con bulbillos en la parte superior del escapo. Los cultivares de cuello duro rinden 4-6 dientes por bulbo y por lo regular son difíciles de separar debido a la dureza del escapo. Los cultivares de cuello blando raramente muestran un escapo y rinden 10-40 dientes. Los bulbos de las variedades de cuello blando generalmente suelen ser de menor tamaño que los bulbos de las variedades de cuello duro. La mayor parte de los cultivos comerciales de ajo son de “cuello blando”, debido a que resulta más fácil su cultivo y su vida útil es mayor que las variedades de “cuello duro” (Burba, 2009; Robledo & Tovar, 2012; Robledo & Villalobos, 2013).

2.2 El cultivo del ajo

El ajo es un importante cultivo con una gran capacidad de adaptación, por ello es cultivado en gran parte del mundo desde el nivel del mar, hasta los 3,700 m. Se desarrolla en suelos blandos, con buen drenaje y con una proporción equilibrada de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K). Su crecimiento se ve favorecido por climas frescos a fríos durante el desarrollo inicial, y calurosos y luminosos desde que comienza a formarse el bulbo hasta la cosecha. La formación del bulbo requiere una duración de dos meses a temperaturas de 10 a 15 °C. Cabe mencionar que el sabor del ajo varía, dependiendo del cultivar y el clima en el cual se cultiva. Los mejores ajos son cosechados en zonas templadas, con veranos cálidos y secos (Izquierdo & Quiones, 2001; Song *et al.*, 2007; Lim, 2015).

2.2.1 Usos del ajo

Actualmente el ajo es cultivado alrededor del mundo por su uso culinario y por sus propiedades medicinales. El ajo se emplea en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, además su consumo disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos, favoreciendo la circulación sanguínea. Conjuntamente ha sido ampliamente documentado su efecto antimicrobiano, antifúngico y antioxidante. Así mismo, diferentes estudios han demostrado que el consumo de ajo disminuye la probabilidad de aparición de distintos tipos de cáncer, tales como cáncer de estómago, mama, laringe y próstata (Robledo *et al.*, 2004; Reveles *et al.*, 2009; Haider *et al.*, 2015).

2.2.2 Importancia económica

En la última década es notorio el incremento en la producción de esta hortaliza a nivel mundial (**Fig. 2**). Este incremento es resultado de la creciente demanda en el sector alimentario (empleado en la cocina mediterránea y oriental) y farmacéutico. Por un lado, está el crecimiento en la popularidad de la comida étnica y por el otro, está la persistente publicidad acerca de los beneficios que ofrece la incorporación del ajo en la dieta (De la Cruz & García, 2007).

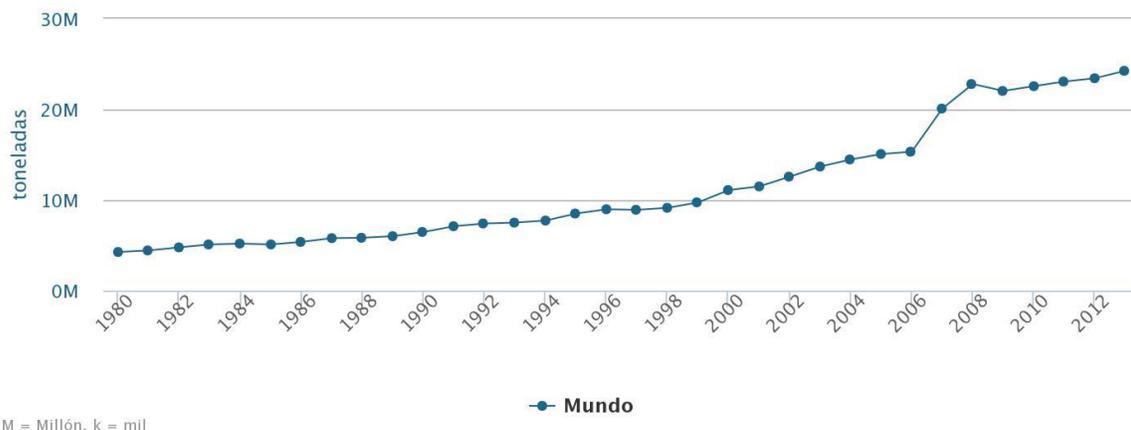


Figura 2. Incremento mundial en la producción de ajo (*A. sativum* L.) desde el año de 1980 hasta el 2013 según la FAO (2014).

El ajo es uno de los veinte vegetales más importantes alrededor del mundo, cultivándose 1, 437,690 hectáreas con una producción anual cercana a las 25 millones de toneladas. Los principales países productores son China, India, República de Corea, Egipto y Rusia (**Fig. 3**), siendo Asia la región más productiva con alrededor del 91% de la producción mundial (De la Cruz & García, 2007; FAO, 2014).

En América el mayor productor de ajo son los Estados Unidos, seguido por Argentina y Brasil. Nuestro país queda relegado a un cuarto lugar con una producción de 59,015 toneladas. No obstante, destaca el papel de México como un país exportador, exportando más del 30% de su producción, lo cual hace de este cultivo una importante fuente de empleo y divisas para nuestro país (Lagunes *et al.*, 2013; FAO, 2014).

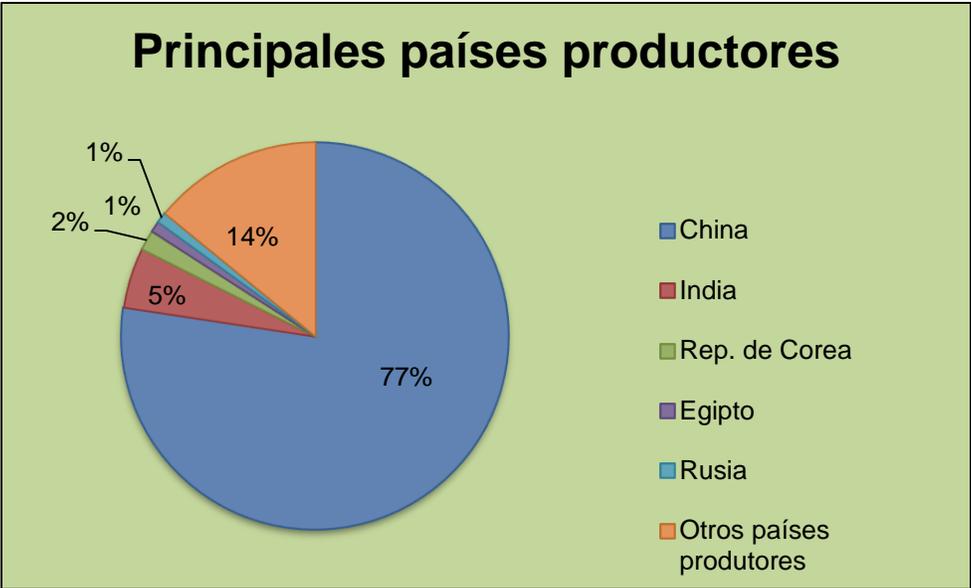


Figura 3. Comparación de los 5 principales países productores de Ajo para el año 2013 de los según la FAO (2014).

De acuerdo con los datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA (2014), los estados de Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California y Sonora concentran el 81% de la producción nacional. Otros estados con destacable participación son Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca y Querétaro, que en conjunto suman el 11% de la producción.

2.2.3 Principales problemas fitosanitarios

La presencia de hongos, bacterias, virus, nematodos e insectos en esta hortaliza tienen un gran impacto en pérdidas económicas. Una de las más relevantes afecciones es la “podredumbre blanca” (**Fig. 4**), provocada por *Sclerotium cepivorum*, la cual se manifiesta en todas las especies domesticas del género *Allium* (ajo, cebolla, puerro y chalote) y en algunas especies silvestres. Otra afección fúngica es la “podredumbre verde”, causada por hongos del género



Figura 4. Ajo contaminado con podredumbre blanca, *S. cepivorum* (Bayer, s. a.).

Penicillium (*P. corybiferum* y *P. cyclopium*). La “podredumbre verde” es fácilmente reconocible por la presencia de fructificaciones conídicas verdes o azuladas sobre los dientes de ajo. Además, el ajo es afectado por *Peronospora destructor*, *Alternaria porri*, *Fusarium oxysporum* y *Puccinia alli* (Robledo & Villalobos, 2013).

El cultivo de ajo es infectado por múltiples virus que hacen compleja su identificación. El complejo viral está integrado por más de ocho especies pertenecientes a los géneros *Potyvirus*, *Carlavirus* y *Allexivirus*, que en conjunto causan la enfermedad denominada el mosaico del ajo. Los potyvirus: virus que producen el enanismo amarillo de la cebolla (Onion Yellow Dwarf Virus: OYDV) y el virus rayado amarillo del puerro (Leek Yellow Stripe Virus: LYSV), y varias especies de allexivirus (GarV-A, B, C, D y X) son los patógenos virales más extendidos en los cultivos del género *Allium* a nivel mundial. Los virus OYDV y LYSV son los más comunes y probablemente los más dañinos al follaje del ajo y por consiguiente los que más afectan el rendimiento y calidad de los bulbos en el mundo (Pérez *et al.*, 2010).

En cuanto a los nematodos que atacan al ajo destaca *Ditylencus dipsaci* (**Fig. 5**), especie más común y de mayor importancia económica en la agricultura por los daños y pérdidas que ocasiona. Los síntomas de *D. dipsaci* son el acortamiento y engrosamiento de las hojas con manchas amarillas o marrones. El <<cuello>> del

bulbo se pone flácido hasta que el bulbo se pudre (Robledo & Villalobos, 2013; Hernández *et al.*, 2015).

Por último, los principales insectos que atacan a este cultivo son *Thrips tabaci* y *Frankiniella occidentalis*. Ambos insectos infestan a los cultivos de ajo en sus etapas de desarrollo inicial, lo cual causa severos daños durante la formación y engrosamiento del bulbo (Robledo & Villalobos, 2013).



Figura 5. *Ditylencus dipsaci* (Grabowski, s. a.).

2.2.4 Mejoramiento genético

El ajo muestra una considerable variabilidad en su morfología, su fisiología y sus características ecológicas. Esta variabilidad se puede apreciar en más de 300 tipos de ajo cultivados alrededor del mundo, los cuales han sido moldeados tanto a las condiciones climáticas como a la demanda del mercado, dando como resultado cultivos distintivos de ciertas regiones. Sin embargo, la carencia de reproducción sexual condiciona la creación de nuevas variedades a la selección de mutaciones espontáneas, lo cual hace que el proceso de mejoramiento sea lento y costoso. Para resolver esta problemática, actualmente se ha recurrido al cultivo de tejidos vegetales como una herramienta biotecnológica en programas de mejoramiento, ya que se pueden emplear técnicas de transformación genética, de manera directa (usando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*) o indirecta (Biobalística) y regenerar plantas con un genoma modificado. El presente estudio se enfocó a la obtención de protoplastos, ya que éstos mismos son la base experimental para la manipulación genética vía hibridación somática, es decir, fusión de protoplastos de dos organismos distintos (Song *et al.*, 2007; Robledo & Tovar, 2012).

2.3 El cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) puede ser definido como un conjunto de técnicas biotecnológicas que tiene una gran variedad de aplicaciones, tales como la micropropagación, la obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos, etc. Estas técnicas tienen en común el uso de un explante, es decir, una parte de la planta madre, por ejemplo, tejidos, órganos, células e inclusive protoplastos (células desprovistas de pared celular). El explante es cultivado asépticamente (*in vitro*) en un medio artificial de composición química definida e incubado bajo condiciones ambientales controladas. El cultivo de tejidos es comúnmente usado como un término general para describir todos los tipos de cultivos vegetales bajo condiciones asépticas y controladas, es decir cultivo de callo (cúmulo de células indiferenciadas), cultivo de meristemas, cultivo de embriones, cultivo de anteras, cultivo de protoplastos, entre otros (Mroginski *et al.*, 2010).

Quizá el primer paso hacia el CTV lo dio Henri-Louis Duhemel du Monceau en 1756, quien durante sus estudios pioneros sobre la cicatrización de heridas en plantas observó la formación de callo. Casi un siglo después tras amplios estudios microscópicos se desarrolló de manera independiente y casi simultáneamente la teoría celular de Matthias Schleiden (1838) y Theodor Schwann (1839). Esta teoría sostiene que la célula es la unidad estructural y funcional de un organismo, siendo ésta una unidad independiente capaz de formar un organismo completo si se le proporcionan condiciones adecuadas (Mroginski & Roca, 1993; Izquierdo & Quiones, 2001; Iliev *et al.*, 2010; Mroginski *et al.*, 2010; Thorpe, 2013).

Las bases teóricas del CTV fueron propuestas 1902 por Gottlieb Haberlandt, quien experimento con células aisladas de hojas fotosintéticas y otras células funcionalmente diferenciadas sin éxito aparente. Sin embargo, Haberlandt predijo que “se podría cultivar con éxito embriones artificiales a partir de células somáticas”. Así claramente estableció el concepto de totipotencialidad celular, es decir la capacidad de células individuales para dividirse, producir todas las células

diferenciadas características de los órganos, y finalmente regenerar en una planta completa (Lee *et al.*, 2009; Iliev *et al.*, 2010; Thorpe, 2013).

2.3.1 Factores importantes en el cultivo de tejidos vegetales

De acuerdo con Iliev y sus colaboradores (2010) el CTV representa “el principal sistema experimental” empleado en los programas de mejoramiento genético, además de ser una excelente herramienta para estudiar la regulación del crecimiento y el desarrollo vegetal. Para su implementación es necesario tomar en cuenta ciertos factores, como son la selección del explante, el medio de cultivo, así como las condiciones ambientales de incubación.

2.3.1.1 Explante

El cultivo *in vitro* inicia sembrando en el medio de cultivo pequeños segmentos de la planta madre (explante). La elección correcta del explante es clave para el éxito del cultivo CTV. Generalmente se emplean explantes procedentes de plantas jóvenes y sanas, preferentemente se toma el explante de zonas en división activa (meristemas). Asimismo, el tamaño del explante juega un papel importante, ya que a mayor tamaño del explante, se incrementa la probabilidad de contaminación. Por otro lado, un explante muy pequeño tenderá a oxidarse y por consiguiente a disminuir la probabilidad de éxito del cultivo (Izquierdo & Quiones, 2001; George, 2008; Mrojinski *et al.*, 2010).

2.3.1.2 Medio de Cultivo

Mrojinski y sus colaboradores (2010) definen al medio de cultivo como “una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos”. Las sales inorgánicas están integradas por macronutrientes (K, Ca, Mg, N, P y S), que son requeridos en mayor cantidad y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, B y Mo), que son necesarios en menor cantidad para el crecimiento vegetal. Además, el medio de cultivo debe contener vitaminas, una fuente de carbono (regularmente sacarosa, aunque también puede emplearse maltosa, galactosa, manosa y lactosa) y según el proceso morfogénico que se busque, reguladores del crecimiento vegetal. Los medios de cultivo pueden ser suplementados con otros compuestos orgánicos como los aminoácidos (prolina, glicina, ac. glutámico, asparagina, etc.) y otros compuestos indefinidos (agua de coco, caseína hidrolizada, etc.) (Izquierdo & Quiones, 2001; Bhojawani & Dantu, 2013).

2.3.1.2.1 Fuentes de Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento vegetal, siendo un componente de las proteínas, de los ácidos nucleicos, además de estar presente en la molécula de la clorofila. En el CTV el nitrógeno inorgánico se suministra por lo general mediante amonio (NH_4 -forma altamente reducida del nitrógeno) y nitrato (NO_3 -forma altamente oxidada del nitrógeno). Es común incluir nitrógeno en forma orgánica en el medio de cultivo, es decir, mediante la adición de urea, aminoácidos o caseína (un complejo de aminoácidos y amonio) (George & De Klerk, 2008; Bhojawani & Dantu, 2013).

Las plantas y de igual manera los cultivos *in vitro* (plantas, órganos, células, callo, etc.) emplean el nitrógeno en su forma reducida (NH_4) en su metabolismo, e internamente, el nitrógeno únicamente está presente en su forma reducida. No obstante, la adición de nitrato es importante para mantener el control del pH y esto ocurre de la siguiente manera: La asimilación del nitrato sólo puede ocurrir a pH

ácido, en tal caso su asimilación va acompañada por la extrusión de aniones, lo cual gradualmente hace al medio menos ácido. Por otro lado, la asimilación de amonio resulta en la excreción celular de protones al medio y por consiguiente la acidificación del mismo. De esta manera el intercambio de iones conserva el balance de las cargas en el medio de cultivo y también pueden ayudar en la eliminación de un exceso de protones o iones hidroxilo (OH^-) genera durante el metabolismo (George & De Klerk, 2008).

En el CTV la morfogénesis y el crecimiento vegetal están influenciados por la disponibilidad de nitrógeno y la forma en la cual este presente (reducida u oxidada). Bhojawani & Dantu (2013) sugieren que la fuente de nitrógeno tiene un efecto significativo en la embriogénesis somática al analizar los resultados obtenidos por Halperin y Wetherell (1965), en los cuales encontraron que al cultivar tejido de zanahoria en medio de cultivo White, conteniendo KNO_3 como única fuente de nitrógeno, la formación de embriones era nula al transferir los explantes al medio de regeneración. No obstante, el desarrollo de embriones se logró al adicionar NH_4Cl como fuente de nitrógeno reducido junto al KNO_3 .

En el caso del nitrógeno en su forma orgánica (casina y aminoácidos) se ha demostrado su efecto en el mejoramiento de la embriogénesis (Bhojawani & Dantu, 2013).

2.3.1.3 Condiciones de incubación

Para brindar las mejores condiciones de crecimiento y desarrollo para el explante es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo, humedad atmosférica e higiene. Por lo general, los cultivos son incubados a $25\pm 2^\circ\text{C}$ con fotoperiodo 16 horas luz/8 horas oscuridad. No obstante, estas condiciones pueden variar dependiendo de la especie. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes (tipo “luz día”), aunque recientemente se ha

extendido la implementación de lámparas led o grow-light (Mroginski & Roca, 1993; Mroginski *et al.*, 2010).

2.3.2 Vías regenerativas

El éxito de los programas de mejoramiento vegetal a través de técnicas moleculares, es totalmente dependiente a la regeneración de plantas completas. Para que la regeneración sea posible, el tejido vegetal (explante) debe atravesar por un proceso en condiciones *in vitro*, denominado morfogénesis. La morfogénesis es el proceso por el cual un organismo desarrolla su forma. Las respuestas morfogénicas pueden ser moduladas tanto por factores intrínsecos de la planta, como por factores extrínsecos (composición del medio de cultivo, reguladores del crecimiento vegetal, temperatura, humedad, etc.). La morfogénesis tiene dos vías regenerativas (organogénica y embriogénica), las cuales pueden conseguirse de manera directa (directamente del explante) o de manera indirecta atravesando por una fase intermedia de formación de células indiferenciadas llamadas “callo” (**Fig. 6**). En la morfogénesis la regeneración puede originarse a partir de una sola célula o de un cúmulo de células (**Fig. 7**).

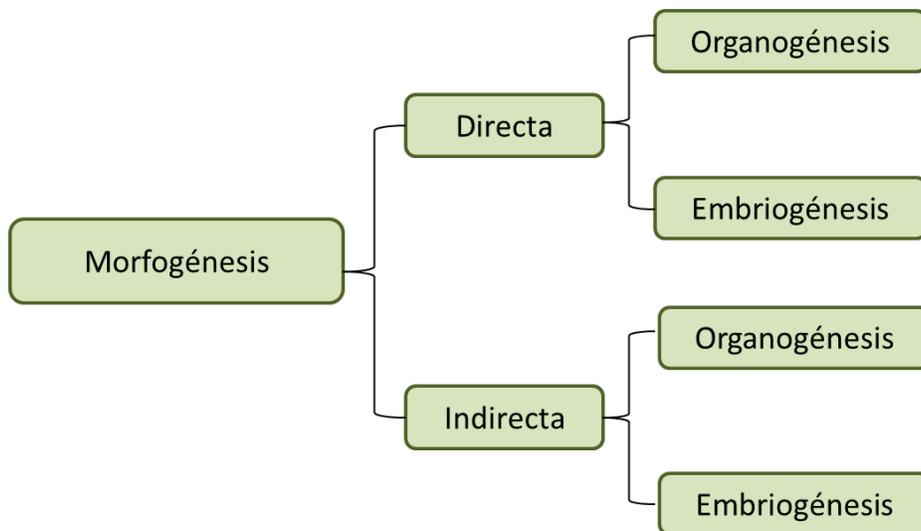
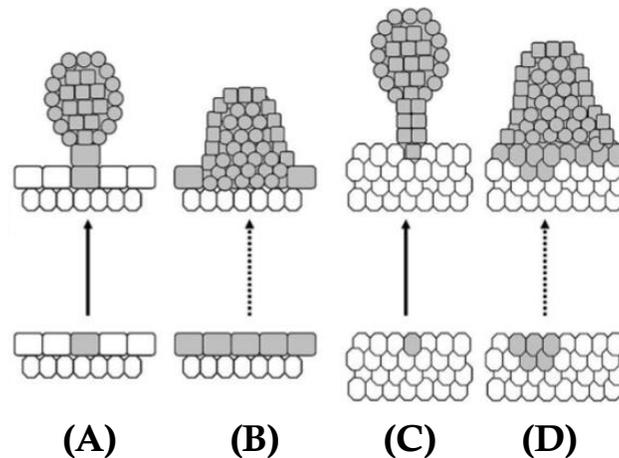


Figura 6. Vías regenerativas de la morfogénesis.

La morfogénesis depende tanto de factores extrínsecos como intrínsecos, tal como la aplicación de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) y la competencia del explante para percibirlos. Diferentes especies, genotipos o explantes pueden necesitar diferentes medios de cultivo o condiciones para inducir la embriogénesis somática o la organogénesis (Quiroz *et al.*, 2006; Radice, 2010; Magyar *et al.*, 2010; Duclercq *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Smith, 2013).



**Figura 7. Morfogénesis directa con origen unicelular (A) y pluricelular (B), morfogénesis indirecta con origen unicelular (C) y pluricelular (D).
Figura tomada de Quiroz *et al.*, 2006.**

2.3.2.1 Organogénesis

De acuerdo con la definición de Thorpe (1993) “la organogénesis es el proceso por el cual células y tejidos se ven obligados a someterse a cambios que llevan a la producción de una estructura unipolar, es decir, brotes o raíces, cuyo sistema vascular a menudo está conectado al tejido progenitor”. En general se reconocen tres fases en la organogénesis: 1) Competencia; 2) Inducción; y 3) Determinación o Morfogénesis. En la primera fase las células del tejido vegetal se desdiferencian. Durante esta fase las células del explante adquieren “**competencia**” para responder a los estímulos exógenos. Posteriormente el explante es comprometido

(**fase de inducción**) de acuerdo a la composición hormonal del medio de cultivo. Por último, el explante es nuevamente determinado (**morfogénesis**) formando un nuevo meristemo funcional, el cual puede funcionar independientemente de señales hormonales externas. La organogénesis en el CTV provee un excelente modelo para estudiar los mecanismos que regulan el desarrollo vegetal (Ozawa *et al.*, 1999; Sugiyama, 1999; Magyard *et al.*, 2010; Elhiti & Stasolla. 2012; Bhojwani & Dantu. 2013).

2.3.2.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES) es el proceso por medio del cual tanto células somáticas como células sexuales, en condiciones de cultivo *in vitro* atraviesan por una serie de cambios morfológicos y fisiológicos, los cuales generan células embriogénicas sin que se haya dado la fusión de gametos. Thorpe (1993) señala que la ES puede distinguirse superficialmente de la organogénesis debido a la producción de estructuras bipolares, cuyo sistema vascular es independiente al tejido madre. El desarrollo de los embriones somáticos puede producirse directamente del explante (ES directa) sin un estadio intermedio de proliferación de células no diferenciadas (callo) o indirectamente a partir de callo (ES indirecta). La semejanza en el desarrollo de los embriones somáticos con los embriones cigóticos (**Fig. 8**) ha hecho de la ES una excelente herramienta para estudios de morfología y fisiología vegetal, así como eventos moleculares y bioquímicos que ocurren durante el inicio y el desarrollo de la embriogénesis en las plantas superiores (Quiróz *et al.*, 2006; Solís *et al.*, 2012).

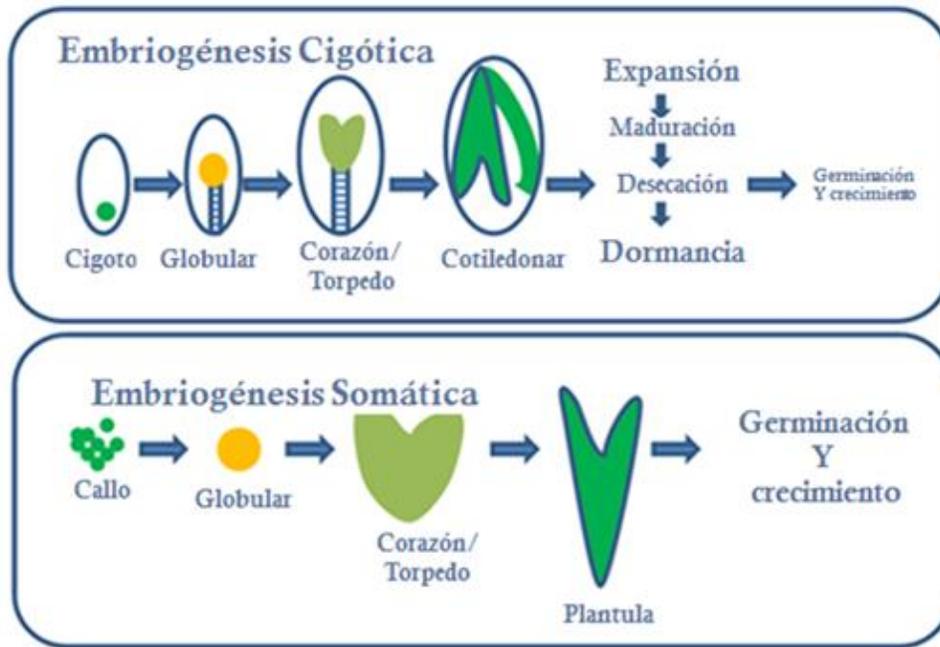


Figura 8. Semejanza en el desarrollo de embriones cigóticos (arriba) con el desarrollo de embriones somáticos (abajo) (Solís *et al.*, 2012).

2.3.3 Caracterización de los cultivos *in vitro*

La proliferación de células indiferenciadas (callo) en el cultivo de tejidos vegetales es análoga a la curva sigmoidea observada en las poblaciones de organismos unicelulares. Para observar la proliferación celular se realiza una gráfica evaluando el número de células, la cual se puede obtener ya sea realizando un conteo celular, o bien, determinando el peso celular (fresco o seco) en un tiempo determinado. La gráfica resultante es llamada cinética de crecimiento (curva de crecimiento). Una cinética de crecimiento típica generalmente atraviesa por cinco fases (**Fig. 9**):

1. **Fase lag o latente:** Es la fase en la cual las células se preparan para el proceso de división celular.
2. **Fase de crecimiento exponencial o acelerado:** Es la fase en la cual se observa la máxima proliferación celular.
3. **Fase de crecimiento lineal:** En esta fase la división celular se ralentiza y las células se agrandan.

4. **Fase de desaceleración del crecimiento:** En esta fase como lo indica su nombre, la proliferación y el crecimiento celular se desaceleran, por lo cual es recomendable cambiar el cultivo celular a un medio de cultivo fresco.
5. **Fase estacionaria:** En esta fase el número de células es constante.

Cabe destacar que el comportamiento de las células durante cada fase de crecimiento es diferente. En muchos procesos experimentales es necesario el uso de callo en un específico punto de la curva de crecimiento, por ejemplo, en el cultivo de protoplastos cuando se emplean células en suspensión, se obtienen mejores resultados si el cultivo celular se encuentra en división activa, es decir, en la fase exponencial de crecimiento. Por otro lado, si lo que se busca es optimizar la micropropagación de una planta de interés, es importante identificar el momento en el que los componentes del medio de cultivo se agotan y deben ser renovados, así como remover las sustancias tóxicas excretadas por la actividad celular.

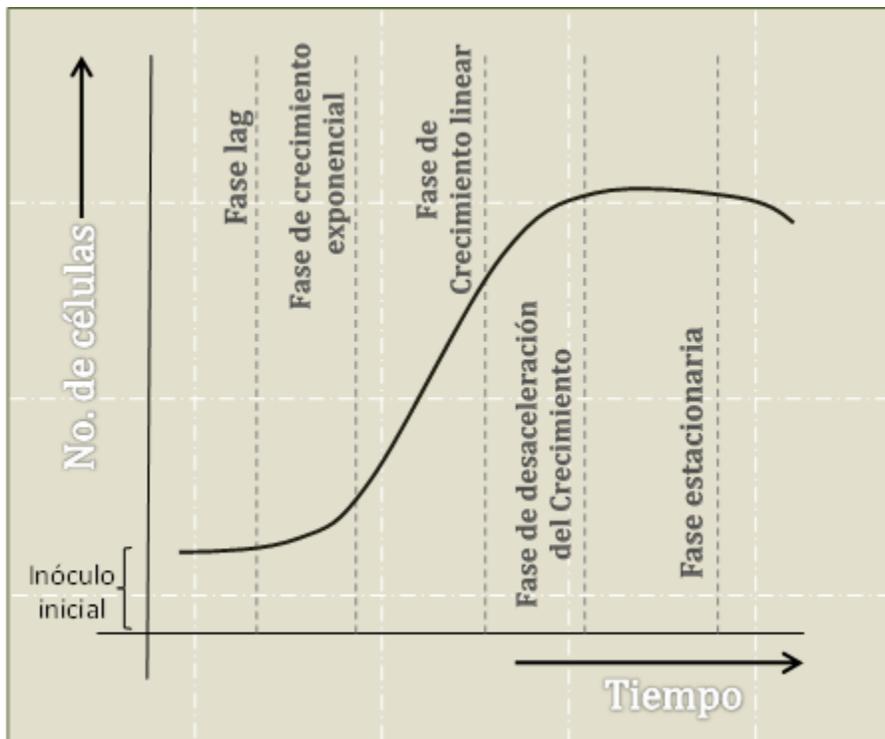


Figura 9. Diagrama de una cinética de crecimiento típica.

El comportamiento de la curva de crecimiento va a depender de la especie a evaluar, estacionalidad, temperatura, fotoperiodo, composición química del medio de cultivo, así como de la cantidad del inóculo empleada. La mayoría de los cultivos de células vegetales alcanzan su máxima densidad celular entre los 18 y 25 días, aunque puede haber cultivos bastante activos que alcanzan su máxima densidad entre los 6 y 25 días (George, 2008; Pérez, 2010; Smith, 2013).

2.3.4 Cultivo de protoplastos

Un protoplasto es una célula desnuda, es decir, una célula desprovista de pared celular (**Fig. 10**). La ausencia de pared celular hace ideales a los protoplastos para la manipulación genética, ya sea mediante hibridación somática y cibrización, o en algunos otros procedimientos de transformación genética que no serían posibles con células intactas. Los protoplastos pueden ser aislados de diversas

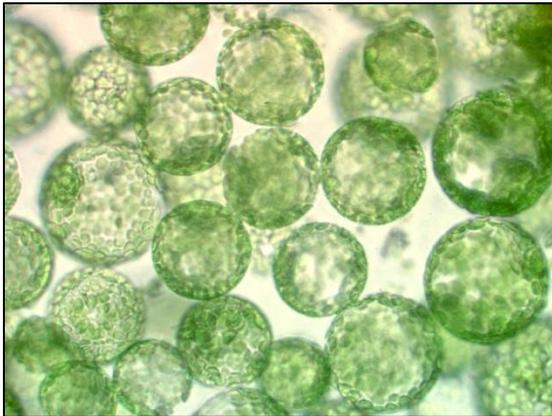


Figura 10. Protoplastos de mesófilo de *Nicotiana tabacum* L. (Davey et al., 2010).

fuentes, tales como callo, suspensiones celulares o directamente del tejido vegetal. En general el aislamiento de protoplastos es influenciado por el genotipo, los factores ambientales y tejidos vegetales (el tipo de explante y la edad fisiológica de la planta). Aunque cualquier tejido primario de la mayoría de las plantas es una fuente potencial de protoplastos, la capacidad de aislar protoplastos capaces de regenerar la

pared celular, seguida de una división celular sostenida y la regeneración de plantas, aún se restringe a un número relativamente limitado de géneros, especies y variedades (Szabados, 1993; Davey et al., 2010; Park et al., 2013).

Generalmente se destacan tres etapas en los experimentos de manipulación genética, estas son: 1) aislamiento de protoplastos; 2) manipulación genética

(fusión de protoplastos o asimilación del gen de interés); y finalmente 3) cultivo de protoplasto y regeneración de plantas. Para iniciar el aislamiento de protoplastos la pared celular es usualmente removida por digestión enzimática (método enzimático). Aunque es posible aislar protoplastos manualmente realizando cortes al tejido vegetal (método mecánico), el método enzimático es actualmente el principal medio para la obtención de protoplastos, quedando relegado el método mecánico a un simple interés histórico (Szabados, L. 1993; Davey *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2013).

El método enzimático consiste en incubar las células o el tejido vegetal en una mezcla enzimática, la cual tiene la función de degradar la pared celular. Las principales enzimas empleadas son la celulasa y la hemicelulasa, para digerir las paredes celulares, además de una enzima de maceración, como es la pectinasa para separar tejidos y agregados celulares (Szabados, L. 1993; Park *et al.*, 2013).

Cabe destacar que en las últimas dos décadas ha decaído el interés en el cultivo de protoplastos, probablemente debido al énfasis en la transferencia de genes específicos en tejidos diana, mediada por biobalística o usando *Agrobacterium*. No obstante, el cultivo de protoplastos sigue siendo fundamental para la transferencia de genes por fusión y algunos aspectos de transformación, en particular los estudios de expresión génica transitoria. Además, los protoplastos mantienen su utilidad como sistema experimental en estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Davey *et al.*, 2010).

2.4 Cultivo de tejidos en *Allium sativum*

Los trabajos con esta especie comenzaron prácticamente desde el inicio del cultivo de tejidos vegetales, dando un gran salto una vez comprendidas las condiciones de cultivo (físicas y químicas), así para finales de la década de 1970, ya se contaba con la regeneración de plantas vía embriogénesis somática, procedentes de callo de disco basal y ápice de tallos (Abo El-Nil, 1977). Actualmente se cuenta con una vasta cantidad de publicaciones en la obtención de embriones somáticos, propagación masiva y regeneración de plantas (**Cuadro 2**), además de contar con trabajos en los cuales se estudia la manera de mejorar la producción de plantas generadas *in vitro*, tal es el caso de los trabajos realizados simultáneamente y de manera independiente por el grupo de Alvarado (2001) y de Ayabe y Sumi (2001), en la obtención de plantas libres de virus mediante el cultivo de meristemas, empleando en ambos casos disco basal como explante.

Cuadro 2. Trabajos previos en la regeneración de ajo (*A. sativum* L.)

Explante	Medio de cultivo			Vía regenerativa	Referencia
	Inducción	Proliferación	Regeneración		
Raíz	Medio MS + CH (0.2 g·L ⁻¹) + Picloram (5 g·L ⁻¹)		Medio MS + KIM (1mg·L ⁻¹)	Organogénesis	Zheng <i>et al.</i> , 2007.
Hoja y raíz	Medio MS + Picloran (2mg·L ⁻¹) + 2iP (1mg·L ⁻¹)		Medio MS + 2,4-D (0.01mg·L ⁻¹) + KIN (5mg·L ⁻¹)	Organogénesis indirecta	Prado <i>et al.</i> , 2011.
Raíz	Medio MS + 2,4-D (1mg·L ⁻¹) + 2iP (0.1 mg·L ⁻¹) + CH (0.2 g·L ⁻¹)		Medio MS + BAP (2mg·L ⁻¹) + ANA (0.02mg·L ⁻¹)	Embriogénesis somática	Scotton <i>et al.</i> , 2013.
Hoja	MacroMS + MicroB5 + VitB5 + 2,4-D (0.5 mg·L ⁻¹) + ANA (0.2 mg·L ⁻¹) + AIA (0.2 mg·L ⁻¹) KIN (0.1 mg·L ⁻¹)	MacroN6 + MicroH + VitB5 + 2,4-D (0.3 mg·L ⁻¹) + BAP (0.1 mg·L ⁻¹)	MacroN6 + MicroH + VitB5 + 2,4-D (0.1 mg·L ⁻¹) + KIN (0.5 mg·L ⁻¹)	Embriogénesis somática	Fereol <i>et al.</i> , 2005.
Raíz, disco basal y hoja.	Medio MS + 2,4-D (2mg·L ⁻¹) + BAP (0.5mg·L ⁻¹)		Medio MS + ANA (2mg·L ⁻¹) + BAP (1mg·L ⁻¹)	Embriogénesis Somática	Haider <i>et al.</i> , 2015.

Por otra parte, y continuando con la línea de desarrollo, destaca el trabajo realizado por Mujica y Mogollón (2004) en el estudio del papel que juega la sacarosa, así como el tipo y la concentración de citocininas en la formación y crecimiento del bulbo. En dicho trabajo se destaca la importancia de las citocininas en el desarrollo del bulbo. Aunque Mujica y Mogollón no encontraron diferencias significativas entre el tipo y concentración de citocininas (Zeatina, BAP y 2iP), mencionan que la mejor respuesta la presentó el tratamiento que contenía $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2iP, con la mayor masa fresca y diámetro ecuatorial en los bulbos, además de presentar una tendencia a la bulbificación múltiple. En cuanto al incremento de la concentración de sacarosa (de 3% a 9%), comprobaron la relación entre el incremento de ésta y el incremento en el peso fresco y diámetro ecuatorial de los bulbos. Posteriormente Mujica y sus colaboradores (2008) retomaron los mejores resultados obtenidos en el trabajo anterior, es decir, la adición de 2iP y 9% de sacarosa al medio de cultivo, para identificar los cambios morfológicos e histológicos que ocurren durante la formación del bulbo de ajo desarrollado *in vitro*.

Todos estos importantes trabajos han sentado las bases para comenzar a desarrollar programas de transformación genética en ajo. Zheng y sus colaboradores (2007) mencionan los trabajos de Barandiaran *et al.* (1998) y Ferrer *et al.* (2000) como los primeros en reportar un protocolo de transformación genética, en el cual obtuvieron la expresión genética transitoria del gen *uidA*, sin embargo, en ambos casos no se logró la regeneración de plantas transgénicas. Poco tiempo después Sawehel (2002) consiguió la transferencia, expresión y la integración estable del gen *hpt*, el cual codifica la enzima higromicina fosfotransferasa, que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Finalmente, Park y sus colaboradores (2002) lograron regenerar plantas transgénicas resistentes al herbicida clorsulfuron.

Con respecto a la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, Robledo y Tovar (2012) mencionan a Kondo y sus colaboradores (2000) como los primeros en establecer un protocolo de transformación en ajo. Posteriormente Zheng y sus

colaboradores (2007) presentaron un sistema de transformación en el cual aparte de producir plantas resistentes a antibióticos y herbicidas, también fue posible producir plantas resistentes a insectos. No obstante, de acuerdo con Robledo y Tovar (2012) hay muy pocas publicaciones referentes a la transformación genética de esta especie.

Finalmente, cabe señalar que las publicaciones realizadas sobre la obtención de protoplastos de ajo son demasiado escasas, lo cual resulta interesante tomando en cuenta que el primer aislamiento de protoplastos se realizó en un miembro del mismo género (*A. cepa* L.) por Klercker usando el método mecánico en 1892. De este modo tuvo que pasar más de un siglo para que Ayabe y sus colaboradores (1995) consiguieran por primera vez el aislamiento mediante el método enzimático de protoplastos y la posterior regeneración de plantas de ajo. Posteriormente Yamashita y sus colaboradores (2002) retomando los resultados anteriores desarrollaron exitosamente un protocolo para obtención de híbridos somáticos entre el ajo y la cebolla vía electrofusión.

III. Justificación

El ajo (*Allium sativum* L.) presenta la característica de ser una especie con reproducción asexual, lo cual hace que los programas de mejoramiento genético tradicionales sean una alternativa lenta y costosa. Además, este tipo de reproducción conlleva el acarreo de enfermedades de una cosecha a otra, dando como resultado un debilitamiento progresivo de las variedades, disminuyendo tanto la calidad como el rendimiento de los cultivos.

Una alternativa para resolver esta problemática es el cultivo de tejidos vegetales, ya que a través de esta técnica se desarrollan protocolos para el establecimiento de cultivos celulares de diversas especies que son utilizados para la implementación de programas de mejoramiento genético. Por otra parte, la fusión de protoplastos podría ser una alternativa viable para la obtención de variedades con nuevas características de importancia agroeconómica, sobre todo en aquellas especies que presentan problemas de incompatibilidad sexual como es el caso del ajo.

En este sentido el presente trabajo tuvo como objetivo establecer las condiciones necesarias para la inducción, proliferación y regeneración de callo embriogénico de ajo, así como las condiciones enzimáticas requeridas para la obtención de protoplastos como paso inicial para futuros trabajos de fusión de protoplastos.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Obtener un protocolo para la inducción, proliferación y regeneración de callos embriogénicos de las variedades Blanca, Morada, Chilena y Jaspeada de ajo (*Allium sativum* L.) y establecer las condiciones enzimáticas para la obtención de protoplastos de la variedad Blanca.

4.2 Objetivos particulares

- Seleccionar un método de desinfección para el establecimiento del cultivo de cuatro variedades de ajo.
- Evaluar diferentes medios de cultivo en cuanto al contenido de nitrógeno para la inducción, proliferación y regeneración de diferentes variedades de ajo.
- Caracterizar el crecimiento de los cultivos celulares a través de cinéticas de crecimiento.
- Evaluar la capacidad regenerativa de cuatro variedades de ajo
- Determinar la concentración y tiempo de exposición a las enzimas para la obtención de protoplastos en la variedad Blanca.

V. Material y método

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, del departamento de Bioquímica, Facultad de Química de la UNAM.

5.1 Diagrama experimental o ruta crítica

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo siguiendo la ruta crítica que se muestra en la **Figura 11**.

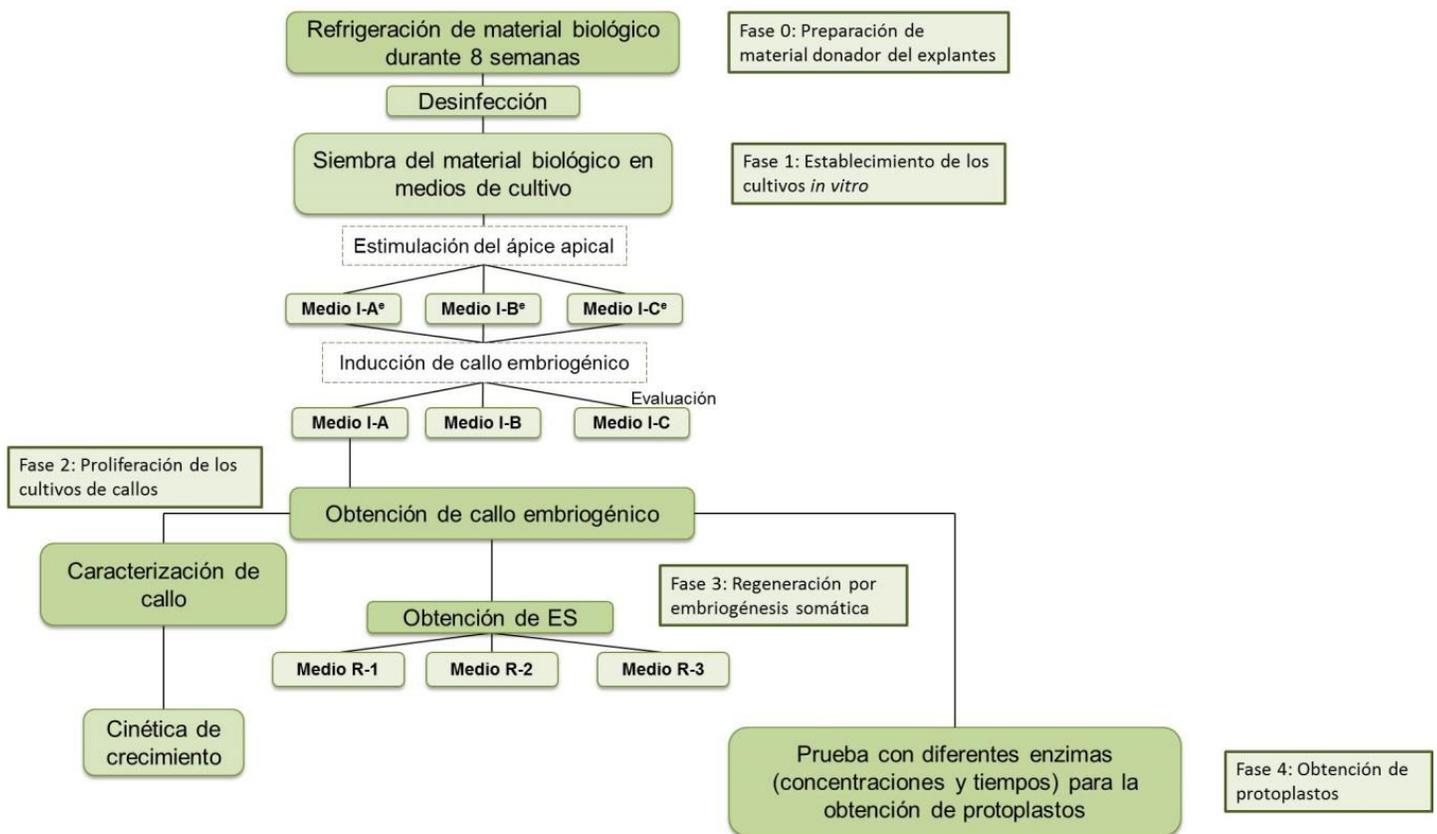


Figura 11. Ruta crítica para la inducción y proliferación de callo embriogénico de cuatro variedades de ajo (*A. sativum* L.), regeneración de embriones somáticos y obtención de protoplastos.

5.2 Material biológico

Como material biológico se emplearon ajos (*A. sativum* L.) de los tipos comerciales blanco, morado, chileno y jaspeado previamente vernalizados durante 8 semanas para estimular la brotación.

5.3 Aspectos generales

5.3.1 Preparación de medio de cultivo

Los medios de cultivo elaborados corresponden a las diferentes etapas del proyecto. Inicialmente se requirió de la estimulación del ápice apical, por lo cual en esta etapa se emplearon tres medios de cultivo sin reguladores (I-A^e, I-B^e y I-C^e). Posteriormente se emplearon los medios de la etapa anterior suplementados con reguladores de crecimiento para la inducción y proliferación de callo embriogénico (I-A, I-B y I-C). Por último, en la tercera etapa se probaron tres medios de cultivo para la regeneración de plantas completas (R1, R2 y R3).

En el **Cuadro 3** se muestran las etapas y los medios de cultivo, así como los componentes de cada medio para un litro de solución. Los medios de cultivo empleados se basaron en la formulación de sales minerales de Murashige y Skoog (MS) (**ANEXO 1**) al 50% y se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X (**ANEXO 2**). Además, fueron suplementados con dos diferentes combinaciones de vitaminas y aminoácidos (Vitaminas R2 y coctel 20) (**ANEXO 3**), así como sacarosa al 3%, agar gel al 0.7%, además de reguladores del crecimiento (auxinas y citocininas). El pH se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl), 0.1N, 1N y 4N, según fuera el caso. Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en una autoclave vertical a una temperatura de 121°C y a una presión de 1.2 kg/cm² durante 18 minutos.

Cuadro 3. Medios de cultivo para la etapa de inducción, proliferación y regeneración en cultivo de disco basal de ajo (*A. sativum* L.)

COMPONENTES DEL MEDIO	MEDIOS DE CULTIVO								
	ETAPA DE ESTIMULACIÓN DEL ÁPICE APICAL			ETAPA INDUCCIÓN Y PROLIFERACIÓN			ETAPA DE REGENERACIÓN		
	I-A ^e	I-B ^e	I-C ^e	I-A	I-B	I-C	R-1	R-2	R-3
Duración	2 semanas			16 semanas			12 semanas		
Sales MS	50%								
Coctel 20	100%	----	----	100%	----	----	100%	50%	----
Vitaminas R2	----	100%	100%	----	100%	100%	----	----	100%
Adenina	10 mg	25 mg	----	10 mg	25 mg	----	10 mg	5 mg	----
Glicina	----	2 mg	2 mg	----	2 mg	2 mg	----	----	2 mg
Glutamina	----	0.5 mg	----	----	0.5 mg	----	----	----	----
L-prolina	2.5 g	----	----	2.5 g	----	----	2.5 g	1.25 g	----
Caseína hidrolizada	200 mg	----	----	200 mg	----	----	200 mg	100 mg	----
Ácido ascórbico	----	10 mg	----	----	10 mg	----	----	----	----
BA	----	----	----	0.3 mg	3 mg	0.15 mg	0.3 mg	0.3 mg	0.3 mg
2,4-D	----	----	----	1 mg	----	1 mg	----	----	----
PVP	----	3 g	----	----	3 g	----	----	----	----
Sacarosa	3%	4.5%	3%	3%	4.5%	3%	3%		
pH	5.7								
Agar gel	0.7%								

Los medios de cultivo empleados en la primera etapa (etapa de establecimiento) fueron adicionados con antibiótico (Cefotaxima[®] 250 mg·L⁻¹) y antimicótico (Terbinafina 250 mg·L⁻¹), ambos componentes fueron adicionados en condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar, cuando el medio registró una temperatura aproximada de 40°C.

El medio de cultivo usado en el cultivo de células en suspensión fue el “medio I-A” sin la adición del agente gelificante (agar-gel).

Para el cultivo de protoplastos se empleó la mezcla de celulasa R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan) y macerozima R-10 (Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan) disuelta en la formulación de sales CPW13M (**Cuadro 4**). En esta fase se empleó el medio CPW13M sin enzimas y el medio CPW21S (**Cuadro 5**) para resuspender los protoplastos.

Cuadro 4. Componentes del medio de cultivo CPW

Medio de cultivo CPW	
Componentes	Cantidad mg L⁻¹
Nitrato de potasio..... (KNO ₃)	101
Sulfato de magnesio..... (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	246
Sulfato de cobre..... (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.025
Cloruro de calcio..... (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	1480
Yoduro de potasio..... (KI)	0.16
Fosfato de potasio..... (KH ₂ PO ₄)	27.2

Cuadro 5. Medio de cultivo CPW13M, CPW21S y CPW

Medio	% de reactivo
CPW13M	13% Manitol
CPW21S	21% sacarosa
CPW	Sólo sales

5.3.2 Métodos de desinfección

A los bulbos previamente refrigerados se les retiro la túnica y una vez desgranado el bulbo compuesto se procedió a retirar los catáfilos a cada bulbo individual (diente). Se prosiguió lavando superficialmente cada bulbo individual con solución jabonosa y agua corriente, para continuar con el procedimiento de desinfección (**Fig. 12**) bajo condiciones asépticas, es decir, dentro de la campana de flujo laminar. Además, se empleó una solución antioxidante para disminuir los efectos abrasivos de los agentes desinfectantes (**ANEXO 4**).

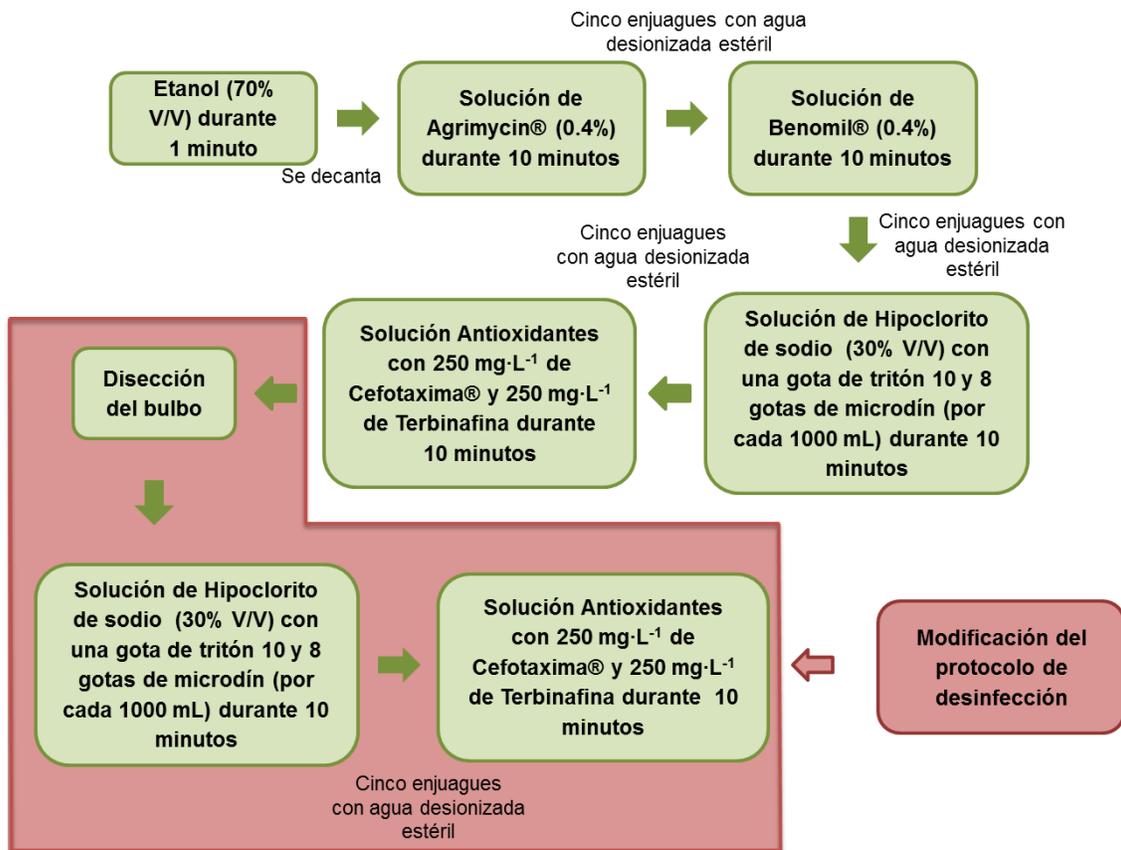


Figura 12. Protocolo de desinfección modificado de Prado *et al.*, 2011.

Una vez concluido el protocolo de desinfección, con ayuda de pinzas y bisturí se diseccionó cada bulbo individual para extraer el disco basal con los primordios foliares más cercanos (**Fig. 13**), el cual fue empleado como explante. Se repitió el procedimiento en cada uno de los medios de cultivo de inducción (**Fig. 12**).

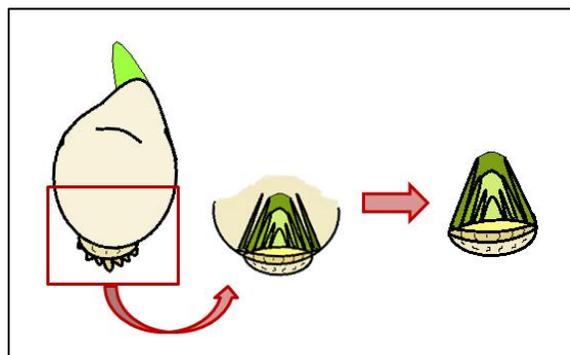


Figura 13. Estructura de bulbo individual en la cual se observa el disco basal.

5.3.3 Condiciones de incubación y subcultivo

Los medios de cultivo sólidos se mantuvieron bajo condiciones de incubación a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y fueron subcultivados mensualmente.

Los medios de cultivo líquidos se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm, bajo las mismas condiciones de incubación que los medios sólidos y los subcultivos se realizaron cada dos semanas.

5.4 Ensayos sobre la inducción y proliferación de callos embriogénicos

Para lograr establecer los cultivos de callos de las cuatro variedades de ajo, inicialmente se indujo sólo con la variedad de ajo blanco, debido a que se contaba con mayor cantidad de material biológico. Para lograr la inducción del callo, fue necesario activar los explantes (disco basal), colocándolos en un medio con sales MS al 50% y sin reguladores de crecimiento (etapa de estimulación del ápice

apical). Después de 10 días de incubación, los explantes ya activados se pasaron a los tres diferentes medios de inducción de callo (etapa de inducción de callo). En esta etapa se seleccionó el medio que mostró la mejor respuesta para emplearlo en las variedades restantes, las cuales también requirieron de la estimulación de los discos basales, para posteriormente pasar los explantes al medio de inducción de callo. Así mismo, se evaluó la eficiencia del establecimiento registrando los porcentajes de contaminación, oxidación, explantes muertos y explantes con callo.

En la etapa de proliferación se utilizó el medio seleccionado en la etapa anterior. En esta etapa se llevó a cabo la caracterización del crecimiento de los callos de las cuatro variedades a través de una cinética de crecimiento, la cual se inició con 1g de callo como peso inicial y se evaluó el incremento del peso fresco (medido en gramos) cada tercer día, durante cuatro semanas. Se realizaron cinco repeticiones por variedad de ajo.

5.5 Obtención de suspensión celular

Para iniciar la suspensión celular se tomaron 12 g del callo obtenido de la variedad blanca en la fase de proliferación y se repartió en 3 matraces Erlenmeyer con 30 mL de medio MS. Se realizó el primer subcultivo dos semanas después y habiendo transcurrido dos semanas más se agregó medio fresco. La suspensión celular se tamizó en un tamiz de disociación celular de la marca SIGMA-ALDRICH®, a través de una malla de acero inoxidable con tamaño de poro de 380 μm (malla 40) para homogenizar la suspensión. Transcurridos cinco días, la suspensión celular homogenizada se empleó en los ensayos para la obtención de protoplastos.

5.6 Ensayos sobre la obtención de protoplastos

Se probaron cuatro diferentes combinaciones de enzimas como se muestra en el **Cuadro 6** y se seleccionó la que presentó la mejor respuesta.

Para los ensayos se tomaron 60 mL de la suspensión celular y se repartieron en cuatro matraces Erlenmeyer de 125 mL. Posteriormente se adicionó 25 mL de medio CPW13M con cada combinación de enzimas (**Cuadro 6**) a cada uno de los cuatro matraces con suspensión celular para ser incubados durante 12 horas, a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad total, con agitación suave (40 rpm) y constante.

Cuadro 6. Concentraciones enzimáticas

	Celulasa Onozuka R 10 ¹		Macerocima R10 ²	
	2%	1.5%	0.5%	0.2%
P-I	●	-----	-----	●
P-II	-----	●		●
P-III	●	-----	●	-----
P-IV	-----	●	●	-----

¹ y ² Marca registrada Yakult®.

Concluido el tiempo de incubación, los protoplastos fueron purificados pasándolos a través de una malla de nailon con tamaño de poro de 60 μm para remover el material de mayor tamaño que no logró digerirse con el tratamiento enzimático. Se continuó pasando cada uno de los tratamientos a tubos falcón de 50 mL para ser centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se añadió medio CPW13M, para realizar el primer lavado (aforando a 40 mL) y posteriormente centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos. Se repitió el paso anterior tres veces. Finalmente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular con 5 mL del medio CPW21S. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se cosecharon los protoplastos con ayuda de una micropipeta, posteriormente se cuantificó la eficiencia con ayuda de una cámara de Neubauer. Se tomaron 5 repeticiones.

Se seleccionó el tratamiento que dio el mejor resultado y se repitió el experimento con dos tiempos de exposición a la solución enzimática, uno de 16 y otro de 24 horas, ambos a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con oscuridad total. Se realizaron los tres lavados con el medio CPW13M centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió de igual forma con el medio CPW21S. Finalmente, se cosecharon los protoplastos y se determinó la densidad de protoplastos obtenidos.

5.7 Ensayos sobre la regeneración de plántulas

Se evaluó la regeneración de plántulas probando tres medios de cultivo diferentes (**Cuadro 3**) a lo largo de tres meses. Para la evaluación se sembró un gramo de callo de la variedad blanca en cada uno de los tres tratamientos y se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento. Posteriormente se seleccionó el que registró los mejores resultados (mayor cantidad plantas generadas) para emplearlo en las cuatro variedades de ajo. De igual manera se evaluó la regeneración de plantas a lo largo de tres meses, colocando un gramo de callo y realizando cinco repeticiones por variedad.

VI. Resultados y discusión

6.1 Ensayos sobre la inducción y proliferación de callos embriogénicos

Para desarrollar este trabajo se tomó como explante el disco basal (**Fig. 13**). Este explante ha dado buenos resultados en trabajos previos enfocados a micropropagación realizados vía organogénesis y embriogénesis somática. Para la obtención de los explantes se disectaron los bulbos de ajo, los cuales fueron sometidos a un protocolo de desinfección similar al empleado por el grupo de Prado (2011). A pesar de que este grupo reportó sólo el 5% de explantes con contaminación, en el presente estudio la prevalencia de contaminación fue elevada en todas las variedades (**Fig. 14**), alcanzando los niveles de contaminación reportados por Brenes & Guillén (2014), es decir, el 60% de contaminación. Como lo indica Smith (2013) el establecimiento de un cultivo puede llegar a ser el mayor reto en algunas estructuras vegetales, especialmente en aquellas que crecen en el suelo o cerca de él, por ejemplo, raíces, tubérculos, bulbos, rizomas, estolones, etc. En este contexto, por sus características el ajo es sumamente afectado por microorganismos, los cuales encuentran en la superficie y en hendiduras de hojas y bulbos buenos refugios, inclusive la contaminación puede llegar a ser inter o intracelular, lo cual hace más difícil eliminarla.



Figura 14. Contaminación del material vegetal. (a) Bulbos contaminados por acción de hongos. (b) Contaminación por hongo y levadura del material *in vitro*.

En el **Cuadro 7** se comparan los componentes y los porcentajes de contaminación de los protocolos de desinfección empleados por el grupo de Prado (2011), por Brenes y Guillén (2014), y el empleado en este trabajo.

Cuadro 7. Protocolos de desinfección

	Prado <i>et al.</i>, 2011	Brenes y Guillén, 2014	En este trabajo
SOLUCIONES			
Etanol 70%	-----	-----	Etanol 70% (1 minuto)
Agrymicin®	-----	-----	4 g·L ⁻¹ (10 minutos)
Agrymicin®+ Zetarán®	-----	5 g·L ⁻¹ de cada compuesto (45 minutos)	-----
Benomil®	4 g·L ⁻¹ (15 minutos)	-----	4 g·L ⁻¹ (10 minutos)
Kasumin®	4 g·L ⁻¹ (15 minutos)	-----	-----
NaClO *	10% V/V 15 minutos	30% V/V 20 minutos	30% V/V 10 minutos
Contaminación	No específica	Principalmente por hongos	Principalmente por hongos
%Contaminación	5%	60%	60%

*En el protocolo de Brenes y Guillén (2014) se tomó como referencia los tratamientos al 30%.

Los agroquímicos empleados en los protocolos de desinfección mencionados en el **Cuadro 7** tienen efecto fungicida, bactericida o ambos (**Cuadro 8**). Los tres protocolos coinciden en el empleo de agroquímicos enfocados a la erradicación de bacterias y hongos. Destacan los resultados obtenidos por el grupo de Prado (2011) al registrar la menor prevalencia de contaminación. La gran diferencia en los porcentajes de contaminación se podría deber a que el grupo de Prado empleó ajos cultivados bajo condiciones controladas en ensayos de campo, mientras que en el caso del trabajo de Brenes y Guillén (2014), y el presente estudio el material vegetal fue proporcionado por los productores de ajo.

Cuadro 8. Agroquímicos

	Tipo de agroquímico	Características generales
Agroquímico		
Agrymicin®	Bactericida	Su acción en los cultivos es sistémica, de rápida absorción por las hojas y órganos verdes de las plantas, penetrando en los tejidos y translocándose a las diferentes partes de la planta.
Zetarán®	Fungicida	Es un fungicida de contacto de aplicación foliar, que crea sobre la superficie foliar una barrera que impide el desarrollo de las esporas del hongo, por lo que establece una condición preventiva.
Benomil®	Fungicida	Es un fungicida sistémico de absorción radical y foliar, selectivamente tóxico para los microorganismos y ataca un vasto espectro de enfermedades ocasionadas por hongos en hortalizas en general.
Kasumin®	Fungicida/Bactericida	Es un antibiótico aminoglicósido, producido por el metabolismo secundario de la bacteria <i>Streptomyces kasugaensis</i> . Esta molécula inhibe la incorporación de aminoácidos a la síntesis de proteínas en bacterias y hongos. Kasumin® es absorbido por hojas y raíces y translocado rápidamente a todas las partes de la planta.

Con el objetivo de disminuir el nivel de contaminación, se modificó el protocolo de desinfección original como se muestra en la **Figura 12**. Después de lavar el material con jabón y agua corriente, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar se inició el protocolo de desinfección colocando los dientes de ajo en una solución de etanol al 70% durante 1 minuto. Este paso es importante para desinfectar la superficie y retirar la capa de cera del material vegetal, la cual sería un impedimento para la absorción de los agroquímicos empleados en los siguientes dos pasos del protocolo. Los agroquímicos empleados presentan ventajas a los empleados en los trabajos mencionados en la **Cuadro 7** ya que su acción es sistémica, se absorben rápidamente y se translocan a todo el tejido,

permitiendo la eliminación de bacterias y hongos (**Cuadro 8**). En cada uno de los pasos anteriores se realizaron tres enjuagues y se pasó el material vegetal a una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 30% V/V con 10 gotas de tritón y 8 gotas de microdín por cada litro de solución. En este paso se disminuyó el tiempo de exposición en comparación con otros trabajos ya que NaClO es un agente oxidante. Como lo mencionan Bhojwani y Dantu (2013) es importante notar que el agente desinfectante es también tóxico para el tejido vegetal. De este modo, la concentración del agente desinfectante y la duración del tratamiento deben elegirse cuidadosamente para minimizar la muerte del tejido. En el trabajo de Brenes y Guillén (2014) se puede observar que los tratamientos con NaClO al 45% presentan un gran porcentaje de explantes muertos ($\approx 50\%$), que en contraparte en los tratamientos de NaClO con 15% y 30% no se observa la muerte de ningún explante.

En el presente estudio se implementó el uso de una solución antioxidante (**ANEXO IV**) con $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cefotaxima® y $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de terbinafina para contrarrestar el estrés generado al tejido vegetal y disminuir la prevalencia de contaminación por bacterias y hongos. Además, después de la disección de los bulbos se agregó un tratamiento de desinfección al disco basal, el cual consistió en una solución de NaClO durante 10 minutos. Como se puede ver en la **Cuadro 9**, se logró disminuir el porcentaje de contaminación a un 30% en la mayoría de las variedades. No obstante, el total de explantes muertos por contaminación y oxidación fue superior al 50% en todos los casos. Una alternativa para mejorar la eficiencia del establecimiento es el empleo de semilla certificada o bien la realización de pretratamientos. Smith (2013) menciona que los bulbos pueden ser liberados de la contaminación de hongos sistémicos con un tratamiento de calor, el cual consiste en colocar los bulbos en agua a 54°C durante 1 hora.

Cuadro 9. Eficiencia del establecimiento

Variedad	No. Explantes	Contaminación	Porcentaje					
			Nivel de oxidación*				Explantes muertos**	Explantes con callo
			X	2X	3X	4X		
Blanca	32	30%	30	40	20	10	55%	45%
Morada	41	40%	20	40	20	20	70%	30%
Chilena	28	30%	30	30	30	10	50%	50%
Jaspeada	25	30%	20	30	30	20	60%	40%

*Nivel de oxidación del explante donde: (X) es del 0 al 25%; (2X) del 25 al 50%; (3X) del 50 al 75%; y (4X) 75 al 100% de oxidación.

**Cantidad total, sumando los explantes contaminados.

A pesar de la contaminación y lo extenso del protocolo de desinfección, la implementación de tejido meristemático como explante (disco basal) es de gran relevancia, ya que la probabilidad de excluir organismos patógenos, provenientes de la planta madre es elevada. Como lo indica Iliiev y sus colaboradores (2010), la zona meristemática no está conectada al sistema vascular de la planta, por lo cual no está en contacto con los virus que viajan a través del sistema vascular. El grupo de Alvarado (2001) demostró mediante una prueba ELISA la reducción de la carga viral en las plantas obtenidas vía organogénesis, empleando el disco basal como explante. Siguiendo la misma línea de investigación, Ayabe y Sumi (2001) comprobaron la eliminación de LYSV en la mayor parte de sus plantas regeneradas empleando el mismo explante. No obstante, es difícil asegurar que las plantas regeneradas no contienen ninguna partícula viral, por lo cual es más apropiado referirse a estas plantas como saneadas o de sanidad controlada (Burba, 2009).

Concluido el protocolo de desinfección, los discos basales de la variedad Blanca obtenidos fueron sembrados en tres medios de cultivo diferentes. En dos de ellos se buscó la inducción de callo embriogénico (I-A y I-C) y en uno de ellos, debido a la poca cantidad de material con el que se contaba de algunas variedades, se buscó la inducción de organogénesis (I-B). Los explantes respondieron favorablemente a los tres tratamientos en la etapa de estimulación del ápice apical debido a que el disco basal al ser un meristemo presenta altos niveles de auxinas

naturales (AIA), las cuales están implicadas en la división y elongación celular, de este modo se estimuló la proliferación celular y se manifestó en el crecimiento de brotes. Los brotes comenzaron a desarrollarse tres días después del establecimiento (**Fig. 15a**) y fueron recortados cada cuatro días para romper la dominancia apical. De acuerdo con el estudio realizado por el grupo de Kahane (1992) en cebolla (*A. cepa* L.), la ruptura de la dominancia apical permite una mejor interacción del explante con los RCV, permitiendo la proliferación de las yemas axilares y generalizando la actividad meristemática en todo el explante. En la **Figura 15b** se puede observar el desarrollo de brotes múltiples debido a la ruptura de la dominancia apical (Machakova *et al.*, 2008).

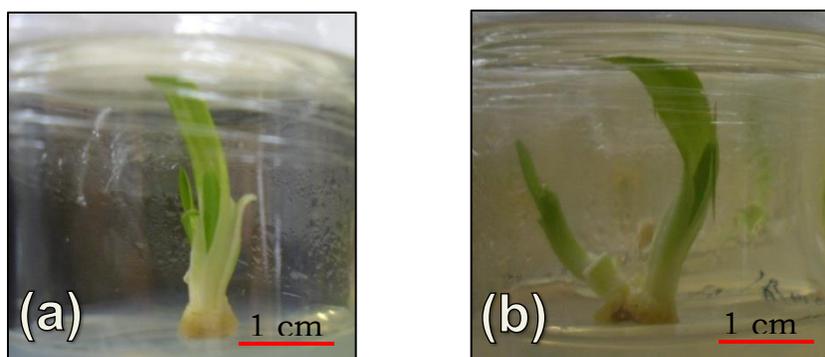


Figura 15. Disco basal con desarrollo de brotes. (a) Desarrollo de brotes a los 5 días del establecimiento. (b) Desarrollo de brotes múltiples a partir de un ápice.

Transcurridas dos semanas de la etapa de estimulación del ápice apical los explantes de la variedad Blanca se subcultivaron en los medios correspondientes a la etapa de inducción y proliferación (I-A, I-B y I-C). En esta etapa los medios de cultivo contenían reguladores de crecimiento para buscar la morfogénesis. En el caso de los medios de cultivo “I-A” y “I-C” se estimuló la formación de callo embriogénico con la adición de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, la cual es una auxina sintética ampliamente usada en la inducción de callo (Maschakova *et al.*, 2008; Smith, 2013). Ambos medios continuaron respondiendo a las condiciones de cultivo durante tres semanas, posteriormente se detuvo el desarrollo de brotes y únicamente los explantes en el medio de cultivo I-A continuaron mostrando resultados. Los explantes bajo las condiciones del medio I-A se hincharon (**Fig.**

16a) y comenzaron a formar callo a las 8 semanas (**Fig. 17**). Por otro lado, los explantes que se encontraban bajo las condiciones del medio I-C comenzaron a oxidarse y el tejido se necrosó (**Fig. 16c**).

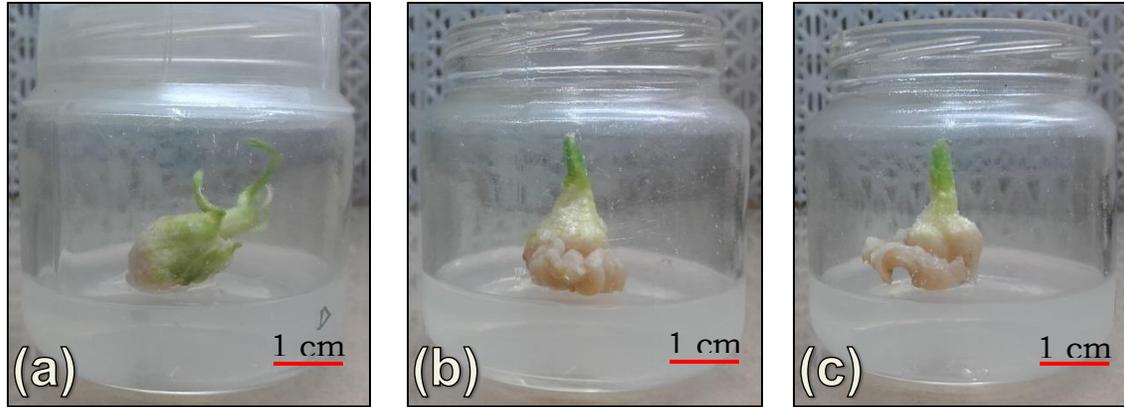


Figura 16. Disco basal. (a) Medio de cultivo I-A. (b) Medio de cultivo I-B. (c) Medio de cultivo I-C.

Haider y sus colaboradores (2015) sugieren que la inducción de callo es determinada en gran parte por la concentración de 2,4-D y citocininas en el medio de cultivo. Como regla general señalan que el porcentaje de inducción de callo se incrementa con la adición de entre $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D, y con adiciones menores a $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, que ha sido la citocinina que ha mostrado los mejores resultados en especies del género *Allium*. Esta afirmación coincide con lo observado por el grupo de Prado (2011), quienes no lograron la inducción de callo con el tratamiento sin auxinas en segmentos basales de hoja y apicales de raíces, empleando sales MS y habiendo transcurrido 90 días de la inducción.

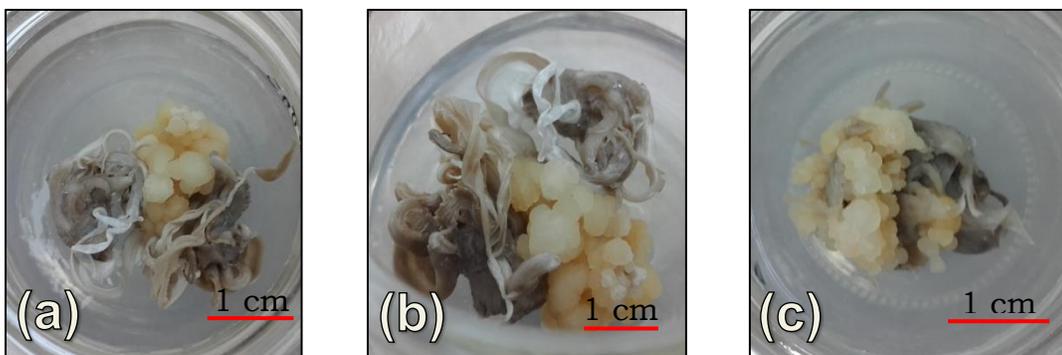


Figura 17. Fase de inducción de callo de ajo, var. Blanca. (a) Inducción de callo a partir del explante (8 semanas). (b) Formación de callo entre hojas envoltentes. (c) Proliferación celular (10 semanas).

Aunque el medio de cultivo I-C cumple con las condiciones establecidas por el grupo de Haider (2015), es decir, “altas concentraciones de 2,4-D y bajas concentraciones de BAP”, no fue posible la obtención de callo. La falta de respuesta podría deberse a la menor cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo. El nitrógeno está presente en su forma oxidada (NO_3^-) y en su forma reducida (NH_4^+) en las sales MS. Este último es empleado por las plantas en su metabolismo e internamente, el nitrógeno se encuentra casi en su totalidad en la forma reducida. El medio “I-C” al igual que el “I-A”, aporta el nitrógeno contenido en las sales MS (KNO_3 y NH_4NO_3) al 50%, y únicamente aporta glicina en pequeñas cantidades como nitrógeno reducido, lo cual hace a este medio de cultivo pobre en aportes de nitrógeno en comparación con el medio “I-A”. El nitrógeno es esencial para los procesos metabólicos ya que es un componente de las proteínas y los ácidos nucleicos, su relevancia en el crecimiento celular y en los procesos morfogénicos se puede apreciar en la gran cantidad de reservas de nitrógeno contenida en las semillas (George & de Klerk, 2008).

En el caso del medio “I-B”, se esperaba obtener más material vegetal vía organogénesis para continuar con el proceso experimental. Se retomaron las condiciones reportadas para promover la formación de brotes múltiples en los miembros del género *Allium*, es decir, relativamente altos niveles de citocininas con o sin la adición de auxinas. En el caso del presente estudio se adicionó $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP y no se adicionaron auxinas exógenas (2,4-D) al medio de cultivo para no interferir con las auxinas endógenas presentes en el disco basal y de este modo obtener el proceso morfogénico esperado (organogénesis). También se adicionaron $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de adenina, la cual ha sido ampliamente usada en muchos medios de cultivo, ya que es una fuente de nitrógeno reducida y actúa en sinergia con las citocininas mejorando el crecimiento de brotes. Aunque no es claro su modo de acción, se estima que la adenina funciona como sustrato para la síntesis de citocininas, de tal manera se esperaba que con su adición al medio I-B mejorara la formación de brotes. Además, en este medio se aumentó el porcentaje de sacarosa a 4.5% debido a que se ha reportado que el nivel de azúcar puede tener un efecto directo en la morfogénesis. Mujica y Mogollón (2004) observaron

en su trabajo enfocado a la bulbificación de ajos tipo “Morado”, que el incremento en la dosis de sacarosa al medio de cultivo es directamente proporcional al aumento en el diámetro ecuatorial y en la masa fresca (g) de los bulbos, lo cual demuestra la importancia de la sacarosa en la organogénesis (Machakova *et al.*, 2008; Van Staden *et al.*, 2008; Gantait *et al.*, 2010).

A pesar de que la formulación del medio “I-B” parecía cumplir con las condiciones para lograr la organogénesis, ningún explante mostró respuesta. Se coincidió con lo reportado por el grupo de Martín (2004), que empleó la misma cantidad de BAP ($3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con sales MS (medio H) en puntas de raíz cultivadas *in vitro*, sin respuesta en ninguna de las tres variedades que evaluaron (tipo rojo, chino y blanco). Por otro lado, Robledo y sus colaboradores (2000) obtuvieron cerca de 170 brotes por gramo de callo empleando 1 mg de 2,4-D y 1 mg de Kinetina en el cultivo comercial ABEN. A su vez, Ayabe y Sumi (1998) evaluaron la capacidad regenerativa en disco basal de la variedad comercial “Fukuchi-howaito” empleando diferentes combinaciones de ANA y BAP (0, 0.1 y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Este grupo no encontró diferencias significativas entre sus tratamientos, obteniendo un promedio de 15 brotes por explante (60 por cada disco basal). No obstante, observaron que la adición de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA inhibe casi por completo la diferenciación de brotes. Con lo anterior se puede afirmar que la respuesta morfogénica de un cultivo *in vitro* va a diferir entre las variedades de una misma especie, por lo cual en futuros estudios enfocados a la organogénesis deberá probarse nuevas condiciones para lograr la organogénesis en las variedades estudiadas.

En el medio de cultivo “I-A” se logró la inducción de callo (**Fig. 17**), el cual se comenzó a observar ocho semanas después del establecimiento del cultivo en la variedad Blanca. Posteriormente se empleó el mismo medio de cultivo para la obtención de callo en las variedades restantes, pasando previamente por la etapa de estimulación del ápice apical. La inducción de callo tomó el mismo tiempo en las variedades Morada y Chilena que en la variedad Blanca, y diez semanas en la variedad Jaspeada. El tiempo de inducción coincide con el registrado por el grupo de Prado (2011) para hoja y raíz, y con el del grupo de Scotton (2013) para raíz.

En ambos casos se usó el medio de cultivo MS adicionado con 2,4-D y la formación de callo se observó entre 60 y 90 días después del establecimiento.

La inducción de callo se observó entre las hojas envoltantes de los explantes que median aproximadamente 1.5 cm de diámetro y fue nula en los explantes de menor tamaño. Este comportamiento es similar al observado por el grupo de Kahane (1992) en la inducción de brotes en disco basal de cebolla (*A. cepa* L.), donde los tratamientos con la mejor respuesta fueron los que tenían mayor cantidad de hojas envainadoras junto al ápice (sin dominancia apical). En este sentido se podría inferir que la morfogénesis es influenciada por la interacción celular del explante. El callo obtenido presentó las características reportadas por los grupos de Sata (2001) y por Robledo (2000), es decir, callo “Compacto, globular y brillante”. Contrario a lo reportado por Hassan y sus colaboradores (2014) quienes encontraron diferencias en la coloración del callo de las variedades japonesa y Bangladés, en el presente estudio se observó uniformidad en la coloración del callo para todas las variedades, siendo éste friable, nodular y de color amarillo (**Fig. 18**).

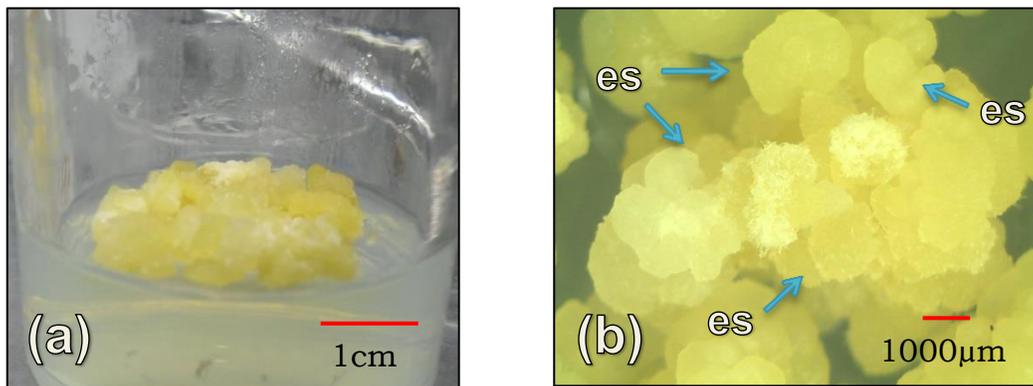


Figura 18. Fase de inducción de callo. (a) Callo embriogénico con coloración amarillo brillante y de consistencia friable. (b) Formación de embriones somáticos (es) en la superficie del callo.

Los resultados obtenidos en la inducción de la embriogénesis somática muestran la importancia de las fuentes de nitrógeno y de los RCV, particularmente del 2,4-D. De acuerdo con Von Arnold (2008), el estrés generado por la acción del 2,4-D desempeña un papel central en la cascada de transducción de señales que

conduce a la reprogramación de la expresión génica. Como posible mecanismo para la disminución de la regulación génica está la metilación del ADN, el cual es influenciado por las auxinas. Este conjunto de eventos a menudo se denomina desdiferenciación. La desdiferenciación es necesaria para hacer a las células receptivas a nuevas señales de desarrollo y que de esta manera adquieran la competencia para la inducción de la embriogénesis somática. La competencia puede ser definida como el estado en el cual una célula es capaz de responder a las señales extracelulares. Además, en esta etapa del presente estudio el 2,4-D cumple otro importante papel ya que promueve la división celular produciendo la proliferación del tejido desdiferenciado (Solís *et al*, 2012; Bhojawani & Dantu, 2013).

Después de la etapa de inducción se continuó con la etapa de proliferación. En esta fase se evaluó la proliferación celular de las cuatro variedades de ajo, empleando el mismo medio de cultivo que en la fase anterior (inducción). En cada una de las cuatro variedades de ajo se realizó una cinética de crecimiento para determinar la proliferación celular (**Fig. 19**). Las variedades Blanca y Morada presentaron la mayor proliferación, mostrando una tendencia de crecimiento similar. La variedad Blanca duplicó su peso fresco a una razón de cuatro semanas. Por otro lado, las variedades Chilena y Jaspeada mostraron una proliferación discreta con un aumento del 40% de su peso fresco.

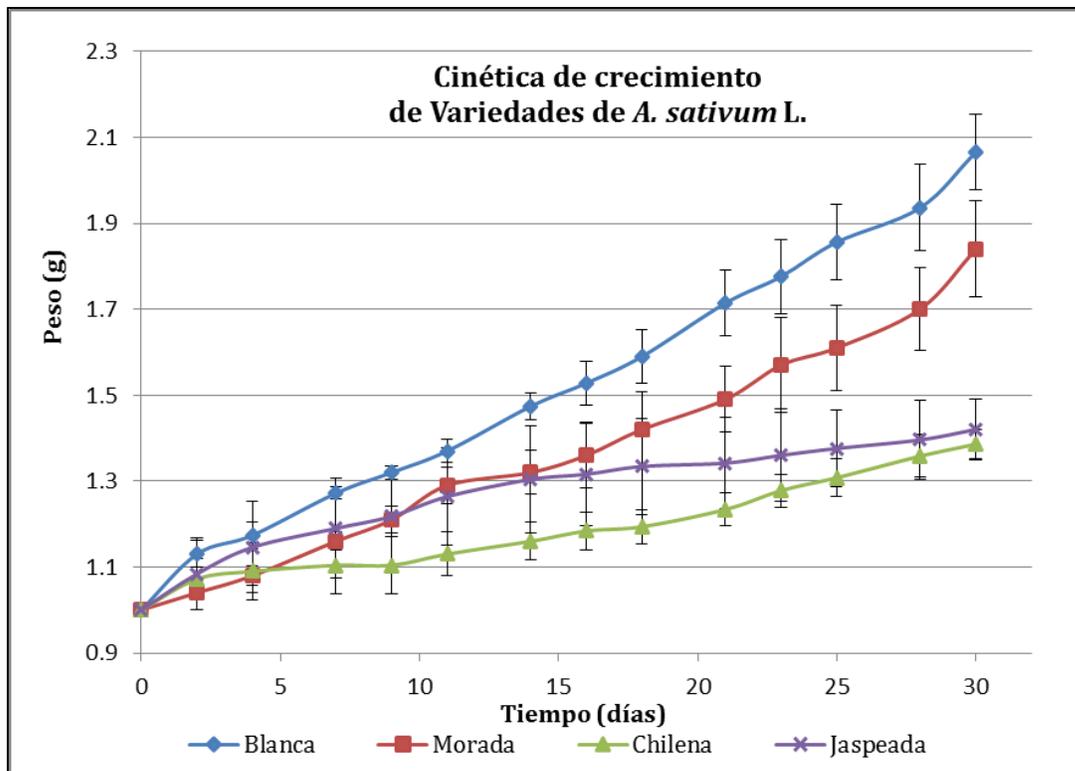


Figura 19. Medición de peso fresco de callo de las variedades Blanca, Morada, Chilena y Jaspeada.

Las cinéticas de crecimiento de las cuatro variedades muestran una marcada fase inicial, la cual corresponde a la fase lag. De acuerdo con Thorpe y sus colaboradores (2008) en esta fase el inóculo inicial puede perder peso fresco al adaptarse al potencial osmótico del medio de cultivo fresco. No obstante, el comportamiento que se observa en los cuatro casos es de crecimiento. Esto podría deberse a la adsorción de agua en los callos, ya que es común la formación de una película de agua sobre el medio de cultivo al ser autoclaveado. La duración de la fase lag difiere entre las cuatro variedades, en la variedad Blanca fue muy efímera durando solo dos días (**Fig. 20a**), mientras que la variedad Chilena dura 9 días (**Fig. 20c**). En las variedades Morada y Jaspeada la fase lag dura 7 días (**Fig. 20b y 20c, respectivamente**).

En la fase lag la existencia de un número bajo de células en división provoca que el comportamiento de la curva de crecimiento sea lento. De acuerdo con Smith (2013) esta fase se caracteriza por la preparación de las células para la acelerada

división celular de la fase de crecimiento exponencial, en la cual el número de células con capacidad de crecimiento va aumentando en forma exponencial. En la fase de crecimiento exponencial, al igual que en la fase anterior, se observa una variación en cuanto a los días de duración y a la ganancia de peso fresco entre las variedades evaluadas. Martín y sus colaboradores (2004) también observaron esa tendencia de variación en la proliferación de callo de los tres tipos de ajo que evaluaron (Rojo, Chino y Blanco), lo cual muestra los diferentes requerimientos fisiológicos y tendencias de crecimiento a las cuales se han adaptado cada una de las variedades *in situ*.

La fase linear es la fase más extensa registrada en la cinética de crecimiento en todas las variedades, su duración va de los 12 días en la variedad Chilena, a los 18 días en la variedad Blanca. Como lo indica Smith (2013), el crecimiento y desarrollo celular es más evidente durante esta etapa, aumentando en volumen y peso. Esta fase fue la última que se registró en la cinética de crecimiento de la variedad Jaspeada (**Fig. 20d**).

Las cinéticas de crecimiento de las variedades Blanca y Chilena mostraron una tendencia de desaceleración del crecimiento después del día 25 de medición, lo cual indica que pasaron a la fase de desaceleración del crecimiento. De acuerdo con Smith (2013) este comportamiento se podría deber a la reducción de nutrientes del medio de cultivo, a la elevada concentración de compuestos tóxicos producto del metabolismo celular o inclusive, a la reducción de O₂. El género *Allium* se caracteriza por la producción de compuestos de azufre y el ajo en particular produce una elevada cantidad de un compuesto llamado allicina al cual se le atribuye el amplio espectro de acción antimicrobial de la especie. Por lo anterior, es posible especular que los productos metabólicos de las variedades de ajo expliquen las diferentes tendencias de crecimiento, de tal manera se puede esperar que la proliferación celular y la duración de cada fase de la cinética de crecimiento dependan de las características intrínsecas de las variedades.

En la fase de desaceleración del crecimiento la ganancia de peso fresco es cada vez menor y termina por cesar totalmente, a este punto se le conoce como fase

estacionaria o de no crecimiento. Ésta última únicamente se registró en la variedad “Chilena” (**Fig. 20c**). Por otro lado, al terminar la fase de desaceleración del crecimiento de las variedades “Blanca” y “Morada” se observó lo que parece ser un segundo crecimiento exponencial. Este comportamiento podría tener dos explicaciones:

- 1) El cultivo de ajo *in situ* es cultivado en sustratos arenosos y con buen drenaje (suelos blandos). En condiciones de cultivo *in vitro* se podría ver reflejado en una baja demanda de nutrientes, razón por la cual la cinética de crecimiento mantiene la tendencia a seguir creciendo.
- 2) Algunos autores como George (2008) y Pérez (2010) proponen una fase más en la cinética de crecimiento, la fase de incapacidad o de muerte celular. En esta fase las células empiezan a morir y en la medida en que su contenido entra en el medio de cultivo, se acelera la muerte de las células vecinas. La muerte celular podría provocar que el callo absorba agua, manifestándose en una hiperhidratación del callo y por ende una ganancia de peso fresco, la cual se ve reflejada en la parte final de la cinética de crecimiento.

La identificación de cada momento en una cinética de crecimiento es importante no sólo para procesos experimentales, también es una valiosa herramienta para optimizar los sistemas de micropropagación. Cabe señalar que, aunque existen numerosas publicaciones enfocadas a la embriogénesis somática, a la inducción de callo y a su proliferación, ningún otro trabajo realizado en este cultivo cuenta con una cinética de crecimiento, incluso aquellos trabajos dedicados a la producción de “semilla certificada”.

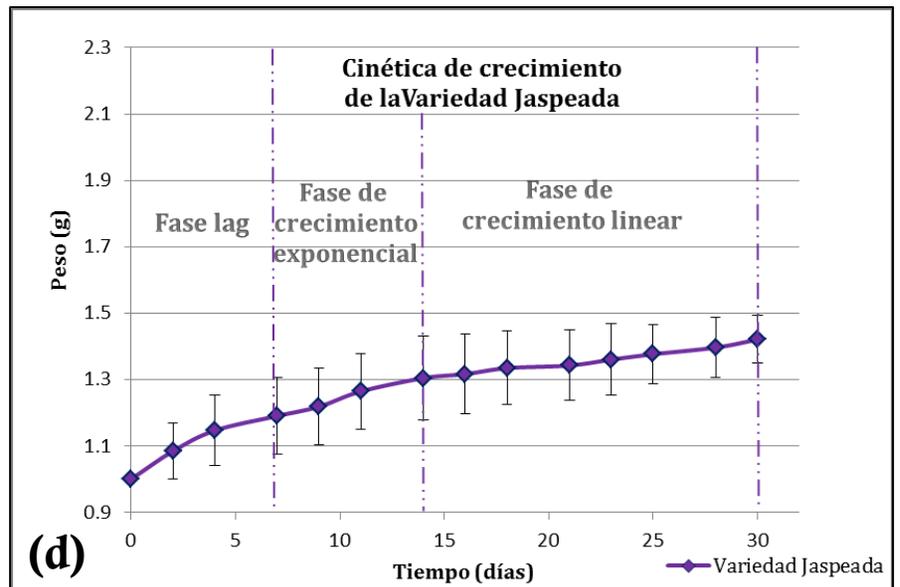
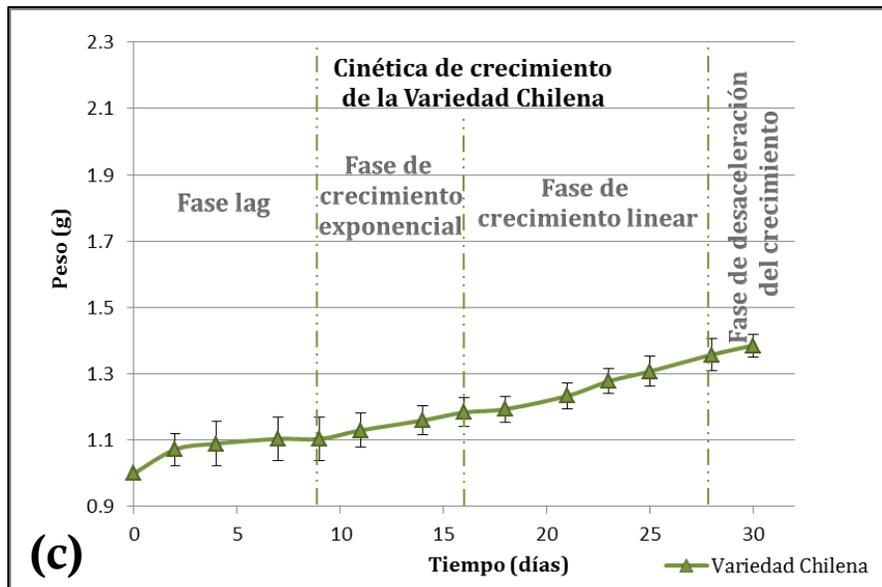
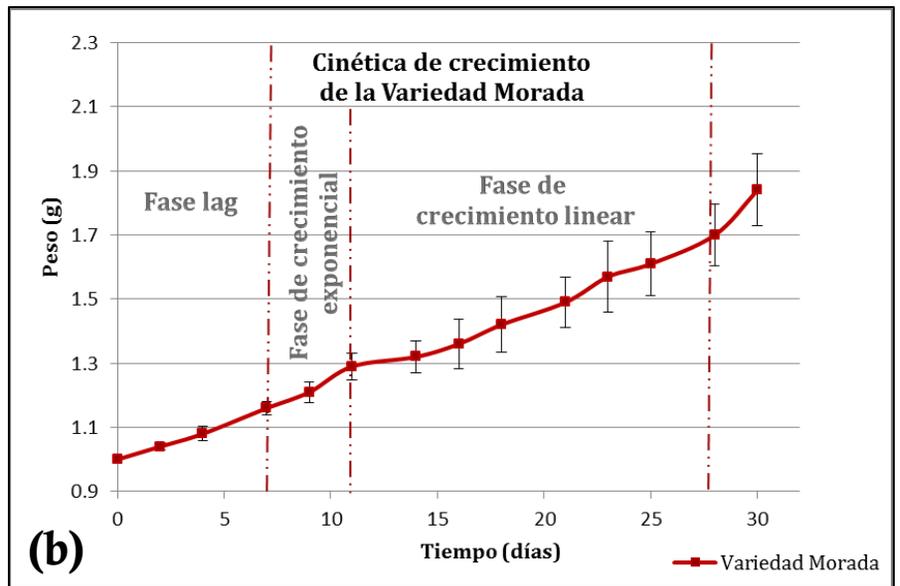
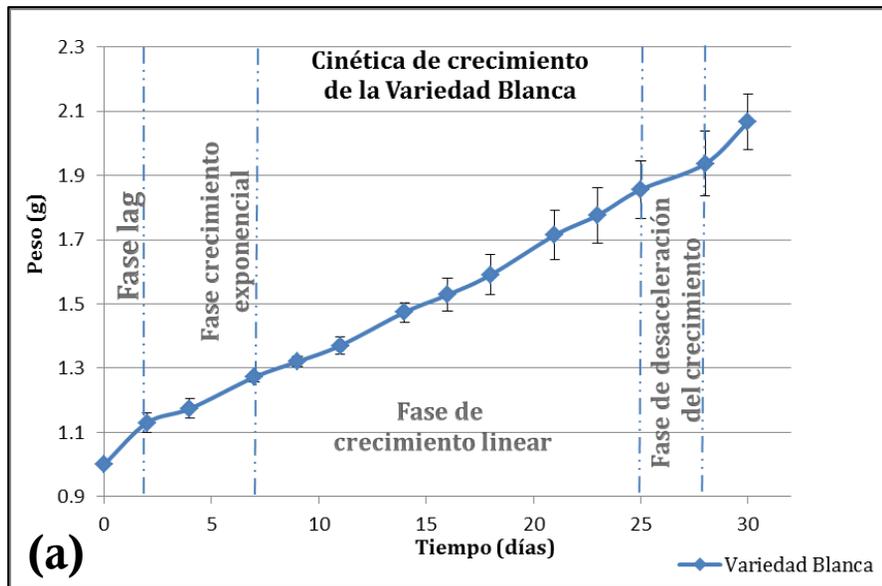


Figura 20. Cinética de crecimiento en la cual se muestran las fases del crecimiento celular de las variedades Blanca (a), Morada (b), Chilena (c) y Jaspeada (d).

6.2 Ensayos sobre la obtención de protoplastos

Para la obtención de protoplastos se probaron diferentes concentraciones de la Celulasa Onozuka R10 y la Pectinasa Macerocima R10 únicamente en cultivos de células en suspensión de la variedad Blanca debido al costo de las enzimas. La Celulasa Onozuka R10 es una enzima derivada del hongo *Trichoderma viride*, rutinariamente usada para el aislamiento de protoplastos por su habilidad para degradar la pared celular, mientras la Pectinasa Macerocima R10 es una enzima derivada de hongos del género *Rhizopus*, la cual se encarga de separar células adyacentes, digiriendo la lámina media que las une, además de poseer actividad hemicelulasa. De acuerdo con Bhojawani & Dantu (2013) estas dos enzimas (ambas producidas por la división farmacéutica de Yakult, en Japón) han sido las más usadas en el aislamiento de protoplastos. De tal manera se probaron cuatro tratamientos enzimáticos (**Cuadro 6**), adicionando 25 mL de solución de cada uno de ellos a 15 mL de células en suspensión, la cual tenía una densidad de 0.049 g de células en suspensión/mL (peso fresco). Los tratamientos fueron incubados durante 12 horas. Concluido el tiempo de incubación, los protoplastos de cada tratamiento fueron purificados a través de una malla de nailon con tamaño de poro de 60 μ m para remover impurezas y el pellet obtenido tras retirar las enzimas de cada tratamiento fue resuspendido en 20 mL de la solución CPW21S. Posteriormente se evaluó la eficiencia de cada tratamiento con la ayuda de una cámara de Neubauer. Los resultados se muestran a continuación en el **Cuadro 10** (Grosser *et. al.*, 2010; SIGMA, 2017; DUCHEFA, 2017; YAKULT, s. a.).

Cuadro 10. Protoplastos obtenidos en los tratamientos enzimáticos

	Protoplastos/mL	Protoplastos/g de células en suspensión
P-I	120	2449
P-II	90	1837
P-III	190	3878
P-IV	70	1429

En general los mejores resultados se generaron con los tratamientos con mayor concentración de celulasa, lo cual coincide con los resultados de Rivera y Jadán (2013) en el aislamiento de protoplastos de *Vasconcellea heilbornii* y *V. stipulata* a partir de callo friable y hojas. El tratamiento que generó mayor cantidad de protoplastos fue el P-III, que contenía la mayor cantidad de celulasa y macerocima con una producción de 3878 protoplastos/g de células en suspensión. Sin embargo, a pesar de que la concentración empleada ha dado buenos resultados en otros trabajos, en el presente estudio se observó que no se logró una óptima digestión enzimática de la pared celular. Los protoplastos con residuos de pared celular no presentaban la característica formas esférica de los protoplastos (**Fig. 21a**). Además, se observaron muchas células elongadas en las cuales no se digirió la pared celular (**Fig. 21b**). Esta tendencia se presentó en los cuatro

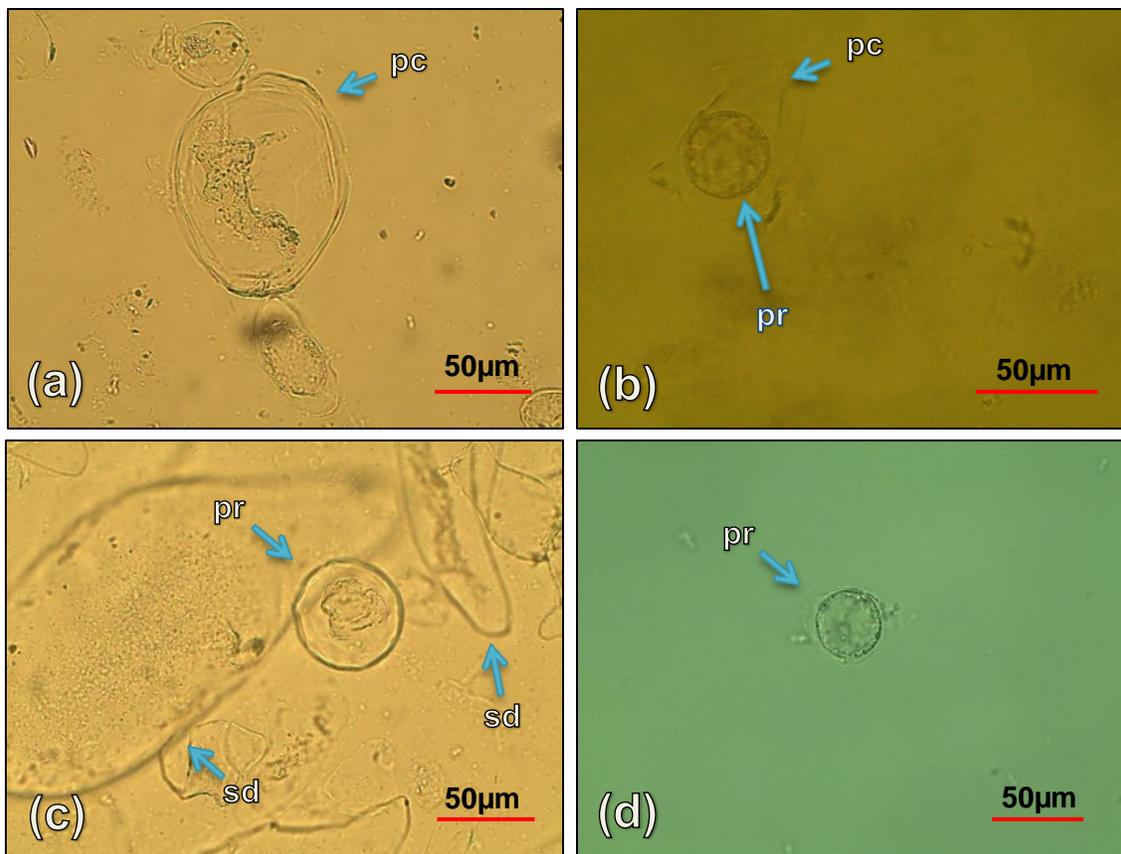


Figura 21. Protoplastos aislados de ajos, var. Blanca. (a) Protoplasto con forma oblonga por residuos de pared celular (pc). (b) Protoplasto isodiamétrico con residuos de pared celular (pr). (c) Protoplasto con células sin digerir (sd) . (d) Protoplastos isodiamétricos.

tratamientos enzimáticos. Probablemente un factor que influyó en la óptima actividad enzimática de los tratamientos fue la temperatura. Bhojawani & Dantu (2013) afirman que la máxima actividad enzimática se presenta entre los 40 y los 50°C. No obstante, las condiciones implementadas en este estudio dieron buenos resultados, obteniéndose protoplastos isodiametricos (**Fig. 21b, c y d**).

Se repitió el experimento con el tratamiento enzimático que mostró los mejores resultados (P-III), evaluando dos tiempos de exposición a la solución enzimática, un tiempo de exposición de 16 y otro de 24 horas. La densidad que registro la suspensión celular empleada en la prueba fue de 0.06 g de células en suspensión/mL (peso fresco). Al igual que en el experimento anterior, los protoplastos fueron purificados y el pellet obtenido resuspendido en 20 mL de la solución CPW21S (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. Protoplastos obtenidos con diferentes tiempos de incubación

	Protoplastos/mL	Protoplastos/g de células en suspensión
P-III 16 horas	270	4500
P-III 24 horas	243	4050

Los resultados obtenidos muestran que el mejor tiempo de incubación es el de 16 horas, mientras que con un mayor tiempo de incubación disminuye la cantidad de protoplastos obtenidos. Se podría suponer que los primeros protoplastos liberados durante la digestión de la pared celular resultan dañados por los efectos tóxicos de la solución enzimática. George (2008) menciona que los protoplastos recién aislados son muy frágiles y están particularmente expuestos a daños físicos y químicos.

6.3 Ensayos sobre la regeneración de plántulas y desarrollo de bulbos

6.3.1 Regeneración de plántulas

Como lo indica Smith (2013) la regeneración de plantas completas es un paso vital para la implementación de aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento vegetal. Para lograr establecer las condiciones de cultivo que favorezcan la regeneración de plantas de ajo se probaron tres medios de cultivo en la variedad Blanca, a los cuales no se les adicionó 2,4-D. Lee y sus colaboradores (2009) mencionan que para lograr la maduración de los embriones somáticos y conseguir la regeneración de plantas se requiere de un medio libre de 2,4-D, ya que la alta concentración usada en la fase de inducción y proliferación tiene un efecto inhibitor del desarrollo en los embriones somáticos. Cabe destacar que los medios de cultivo empleados en esta fase diferían en la cantidad de nitrógeno contenido. George & de Klerk (2008) señalan que tanto el crecimiento como la morfogénesis en los tejidos vegetales son marcadamente influenciados por la disponibilidad de nitrógeno y la forma en la cual está presente en el medio de cultivo (oxidada o reducida). La importancia de los requerimientos de nitrógeno durante la embriogénesis puede estar correlacionada con la continua síntesis de proteínas y ácido nucleicos demandados por las células en proliferación, además de ser fundamental para mantener el pH del medio de cultivo (Bhojawani & Dantu, 2013).

Los resultados de los ensayos sobre la regeneración de plántulas se muestran a continuación en el **Cuadro 12**. El tratamiento que mostró los mejores resultados fue el medio de regeneración 2 (R-2) con un total de 47 plántulas, es decir, 9.4 plántulas por gramo de callo empleado como inóculo. En el medio de regeneración 1 (R-1) se obtuvieron un total de 24 plántulas (4.8 Plántulas/g de callo) y en el medio de regeneración 3 (R-3) no mostró ningún resultado.

Cuadro 12. Regeneración de plántulas en la variedad Blanca

Tratamiento	No. de plántulas/g de callo	No. total de plántulas
R-1	4.8	24
R-2	9.4	47
R-3	0	0

En el medio de regeneración R-1 la primera respuesta se observó a las cuatro semanas con cambios en la pigmentación y en la textura del callo (**Fig. 22a y b**). Además, en este periodo se observó la formación de plántulas incipientes. No obstante, la mayor cantidad estructuras se formaron hasta los dos meses, predominando las estructuras radiculares (**Fig. 22c y d**). Las estructuras foliares continuaron creciendo, mientras las radiculares cesaron su crecimiento una semana después, para posteriormente oxidarse. George y de Klerk (2008)

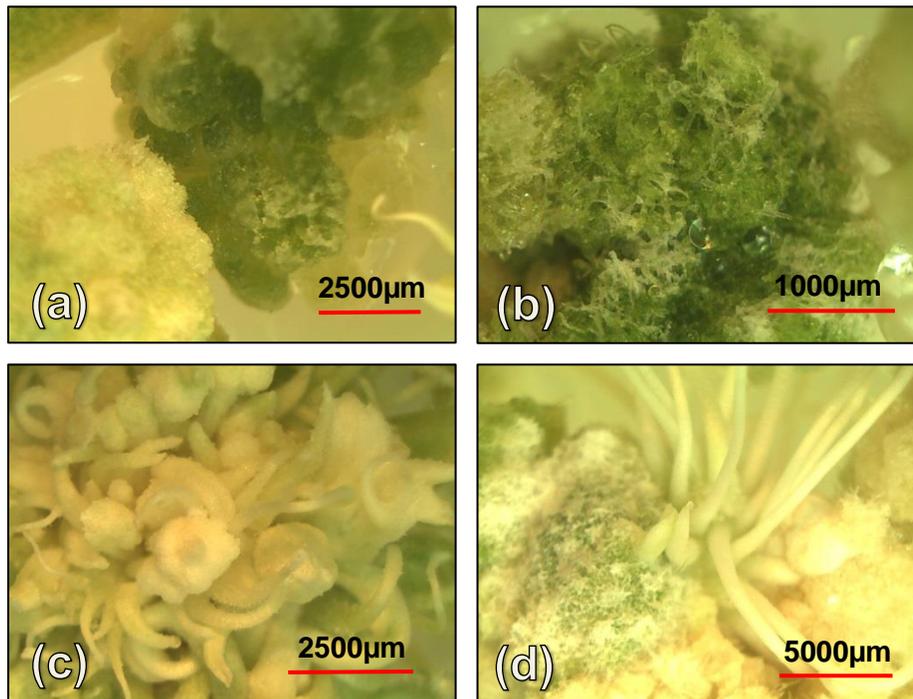


Figura 22. Fase de regeneración en var. Blanca con el medio R-1. (a) Cambios en pigmentación y textura del callo. (b) Acercamiento a callo en el cual se observa la respuesta al medio de regeneración. (c) Formación de estructuras radiculares. (d) Crecimiento de estructuras radiculares.

mencionan que el crecimiento de las plántulas puede deteriorarse en medios con un alto contenido de amonio, incluso cuando se eleva la cantidad de nitrato para controlar el pH del medio de cultivo. Por otro lado, el descontrol en el desarrollo manifestado por los callos de este medio, se podría deber a que el nitrógeno reducido, el cual está en mayor cantidad, se asimila rápidamente ya que no requiere un gasto energético como el nitrato. La gran cantidad del ion amonio permite una rápida síntesis de aminoácidos, los cuales se suman a los aminoácidos contenidos en el medio de cultivo para la síntesis de proteínas. Esta acelerada dinámica podría descontrolar la maduración de los embriones somáticos, lo cual se ve reflejado en la disminución de la cantidad de plántulas generadas por gramo de callo.

Los mejores resultados los presentó el medio de regeneración R-2 con la mayor cantidad y calidad de plántulas generadas. Contrario a lo observado en el medio R-1, los callos inoculados en este medio de cultivo tuvieron un proceso de maduración muy marcado, emulando las etapas de la embriogénesis cigótica (**Fig. 23**). Durante las primeras semanas se observó la compactación de estructuras globulares (**Fig. 23a**), correspondiendo con la etapa globular del desarrollo embrionario, en la cual describe Taiz y Zeiger (2015) que el primer patrón de diferenciación es radial. También se observó la formación de estructuras semejantes a suspensores, las cuales conectaban a los embriones somáticos formados con el callo nodriza (**Fig. 23b**). Von Arnold (2008) menciona que el suspensor tiene un papel activo en el desarrollo del embrión, ya que al inicio de la embriogénesis las células del suspensor muestran una mayor actividad transcripcional, además de ser una estructura encargada del transporte nutrientes y RCV, lo cual en conjunto va a dar como resultado el desarrollo continuo del embrión. Cabe señalar que en la embriogénesis cigótica comienza a inhibirse la actividad del suspensor a medida que continúa el crecimiento del embrión, para que finalmente se de la muerte celular programada del suspensor. Este mismo proceso se presentó en este tratamiento como se puede observar en la **Figura 23c**. Después de la compactación de las estructuras globulares se comenzó a observar la formación de brotes incipientes (**Fig. 23d**). La formación de los

primeros brotes se registró a las cuatro semanas, una semana más que lo registrado por el grupo de Robledo (2000) usando como explante puntas de raíz.

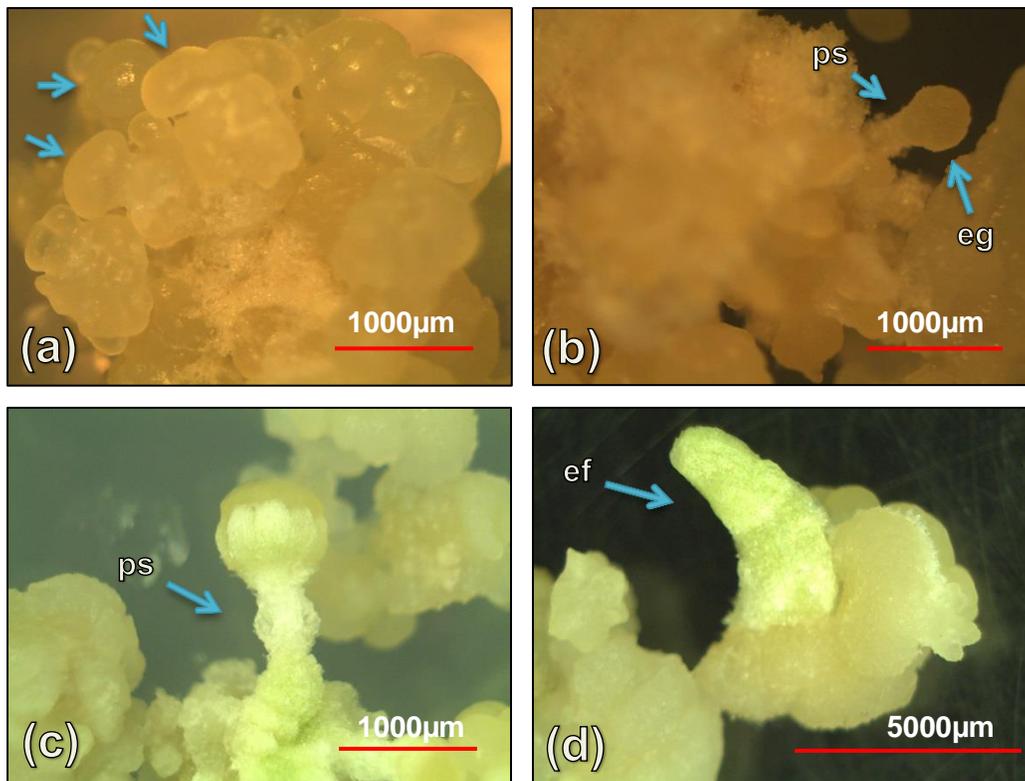


Figura 23. Maduración de embriones somáticos en callos de ajo, var. Blanca con el medio R-2. (a) Formación de estructuras globulares (eg). (b) Estructura similar a un suspensor. (c) Muerte celular de estructura que se asemeja a un suspensor (ps). (d) Formación de estructuras foliares (ef).

En el medio de regeneración R-3 se observó la formación de estructuras globulares después de la primer semana (**Fig. 24a**). Estas estructuras no eran tan compactas y se encontraban en menor cantidad comparadas con las observadas el medio R-2. La segunda semana se observó que algunos cúmulos de callo se hiperhidrataron, cambiando la coloración inicial del callo a una tonalidad blanca (**Fig. 24b**). Posteriormente este mismo comportamiento se extendió y habiendo transcurrido ocho semanas el 70% del inóculo presentaba las mismas características (**Fig. 24c**). Finalmente el callo se oxidó y no se logró obtener ninguna plántula (**Fig. 24d**).

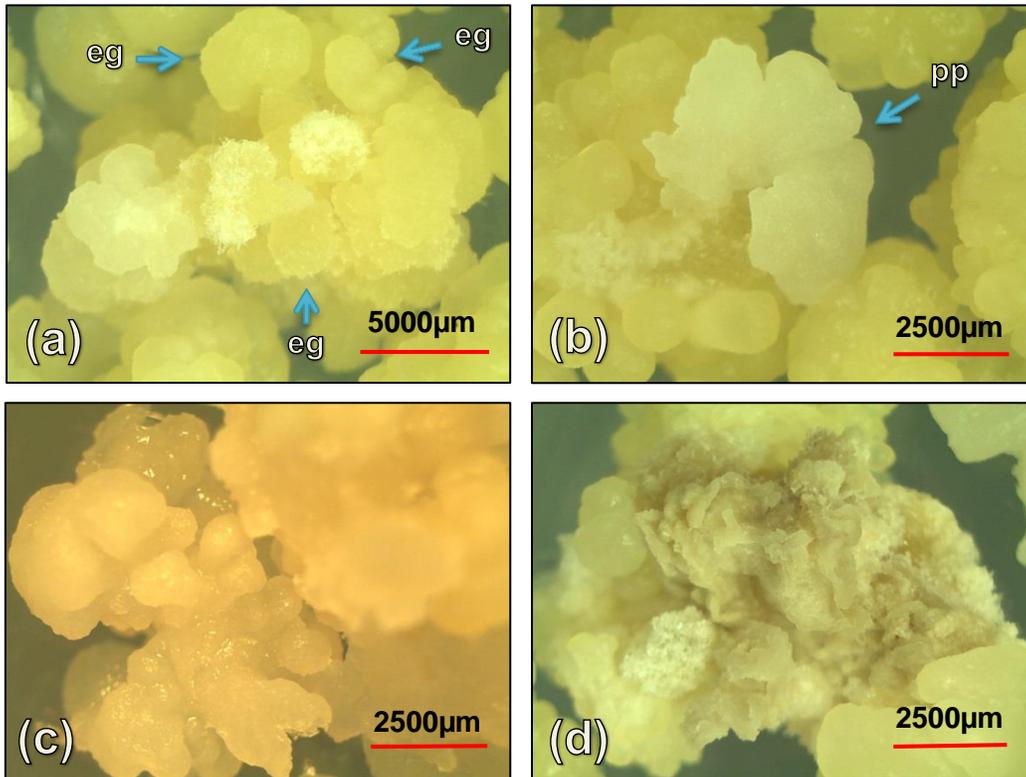


Figura 24. Fase de regeneración en var. Blanca con el medio R-3. (a) Formación de estructuras globulares (eg). (b) Pérdida de pigmentación (pp) en algunos cúmulos de callo. (c) Pérdida de pigmentación e hiperhidratación. (d) Oxidación del callo.

Los resultados obtenidos en los tres tratamientos muestran un gradiente de respuesta a las condiciones de cultivo, donde las mejores condiciones para la obtención de plántulas las presenta el medio R-2. De acuerdo con Ziv y Chen (2008) las condiciones de cultivo afectan los gradientes internos de respuesta del inóculo (callo), ya que alteran su sensibilidad al estrés y cambian los patrones de señalización celular. En este sentido, cabe suponer que la composición del medio de cultivo va a modular la maduración de los embriones somáticos y, por tanto, su germinación. Aunado a lo anterior George & de Klerk (2008) afirman que la morfogénesis es influenciada por la cantidad total de nitrógeno contenida en el medio de cultivo, por tal motivo sugieren considerar dos importantes factores: 1) la concentración total de nitrógeno; y 2) la proporción nitrato/amonio. Con el objetivo de comparar la cantidad total de nitrógeno y la proporción nitrato/amonio contenida en los medios de cultivo de regeneración, se realizó un cuadro (**Cuadro 13**) como

el empleado por el grupo de Luciani (2001). En el cuadro se puede observar que el medio R-1 contiene la mayor cantidad de nitrógeno en ambas formas (oxidada y reducida), además de contener la mayor cantidad de nitrógeno total, seguido por el medio R-2 y el medio R-3. La mayor proporción nitrato/amonio la presenta el medio R-3, mientras que los medios R-1 y R-2 contienen la misma proporción. Comparando la cantidad y proporción de nitrógeno con la cantidad de plántulas generadas, se podría suponer que una cantidad elevada en la razón nitrato/amonio inhibe la generación de plántulas. Esta idea contradice lo afirmado por el grupo de Luciani (2001), quienes afirman que una cantidad elevada en la razón nitrato/amonio favorece la respuesta morfogénica. No obstante, en este trabajo se da más importancia al amonio y a los aminoácidos como fuente de nitrógeno ya que el nitrato, una vez dentro de la célula debe ser reducido a amonio antes de ser utilizado biosintéticamente (George & De Klerk, 2008).

Cuadro 13. Proporción nitrato/amonio en los medios de regeneración en la variedad Blanca.

Fuente de nitrógeno	Medio de cultivo de regeneración		
	R-1	R-2	R-3
KNO₃	18.8/0	9.4/0	9.4/0
NH₄NO₃	20.6/20.6	10.3/10.3	10.3/10.3
Coctel 20	0/169.87	0/84.93	-----
Adenina	0/0.074	0/0.037	-----
Glicina	-----	-----	0/0.026
Prolina	0/21.7	0/10.85	-----
Nitrógeno total	251.6	125.8	30
N^{oxi}/N^{redox} total*	39.4/212.2	19.7/106.1	19.7/10.3
% N^{oxi}/N^{redox} total	15.6/84.3	15.6/84.3	65.6/34.3
Proporción total	0.19	0.19	1.9
Total de plántulas generadas	24	47	0
No. de plántulas/g de callo	4.8	9.4	0

*Proporción de las fuentes de nitrógeno oxidadas (N^{oxi})/fuentes de nitrógeno reducidas (N^{redox}).

Como se puede apreciar en el cuadro anterior, el nitrógeno es aportado en mayor cantidad en forma reducida, por lo cual se podría suponer que la respuesta

diferencial presentada en los tres medios de regeneración se deben al efecto que tiene esta forma de nitrógeno sobre el tejido vegetal. En un extremo con la mayor cantidad de nitrógeno reducido están los resultados obtenidos en el medio R-1, donde no se regula la formación de plántulas y la mayor parte del callo termina formando estructuras radiculares. En un punto intermedio esta la respuesta observada en el medio R-2 con una modulación en la formación de plántulas y en el otro extremo, con el menor aporte y sin respuesta aparente está el medio R-3. No obstante, aunque el nitrógeno en su forma reducida se asimila directamente y con menor gasto energético que el nitrógeno en su forma oxidada, este último parece ser indispensable para la maduración de los embriones somáticos (Gamborg & Shyluk, 1970).

Para evaluar la capacidad regenerativa de las cuatro variedades se empleó el medio R-2. Los resultados se muestran a continuación en el **Cuadro 14**. Se puede observar que la variedad “Chilena” generó la mayor cantidad de plántulas, logrando 29.2 por gramo de callo empleadó como inóculo. A su vez las variedades “Morada” y “Jaspeada” presentaron la menor cantidad de plántulas generadas con tan solo 1 por gramo de callo. Mientras que la variedad “Blanca” generó 9.4 plántulas por gramo de callo.

Cuadro 14. Plántulas generadas en cuatro variedades de ajo*

Variedad	No. de plántulas/g de callo	No. total de plántulas
Blanca	9.4	47
Morada	1	5
Chilena	29.2	146
Jaspeada	1	5

*En tres meses en el medio R-2.

De acuerdo con Ziv & Chen (2008), la expresión morfogénica de un cultivo *in vitro* resulta de la interacción entre factores intrínsecos (genotipos) y extrínsecos (composición del medio de cultivo y condiciones físicas de crecimiento), estos últimos se discutieron previamente. Dentro de los factores intrínsecos se podría

esperar que en condiciones de cultivo *in vitro*, algunas variedades de ajo sean morfológicamente más competentes para diferenciarse y generar plántulas que otras. Como ya se mencionó en los ensayos sobre la inducción y proliferación de callos embriogénicos, la competencia puede ser definida como el estado en el cual una célula es capaz de responder a las señales extracelulares. En este sentido, Barandiaran y sus colaboradores (1999) destacan que la influencia del genotipo es un importante factor a considerar en la regeneración de plantas. Este grupo analizó la variación en la regeneración en 20 genotipos de ajo. Los resultados que obtuvieron muestran una gran variación en la capacidad de regeneración entre genotipos, que va desde la producción de 0.2 plántulas/g de callo (Ajo de tipo Blanco) hasta 15.3 plántulas/g de callo empleando el medio MC3 (basado en las sales B5). Contrario a lo registrado en el presente estudio, el grupo de Barandiaran registró que los ajos de tipo Blanco tiene una capacidad de regeneración baja, con un máximo de 2.4 plántulas/g de callo y una tendencia a generar 0.5 plántulas/g de callo. Esta contradicción ilustra la importancia tanto del genotipo como de la composición del medio de cultivo.

El grado de competencia de cada variedad podría estar correlacionado con sus características fisiológicas. Por ejemplo, Burba (2009) menciona que los ajos Blancos y Chilenos *in situ* son de cosecha temprana (precoces), mientras que los Jaspeados son de cosecha tardía, por tanto lo que se esperaría es que los dos primeros respondan con mayor facilidad, justo como se observó. Además, el mismo Burba señala que los ajos Chilenos tienen bajos requerimientos de frío *in situ*, de tal manera se podría pensar que en condiciones *in vitro* esta variedad requiera de una menor estimulación para la formación de plántulas, es decir, su grado de competencia sería mayor, lo cual explicaría la mayor formación de plántulas registradas en esta variedad. Sin embargo, esta reportado que los ajos Morados son de cosecha temprana y los resultados obtenidos fueron similares a los de la variedad Jaspeada, por lo cual no es posible generalizar la correlación del comportamiento *in situ* e *in vitro*.

6.3.2 Desarrollo de plántulas y formación de bulbos

Aún cuando no se planteó como objetivo la obtención de bulbos, este proceso morfogénico se dio de forma natural durante el desarrollo de las plántulas regeneradas, por lo cual se retomaron plántulas regeneradas de la variedad Blanca para registrar el proceso de formación del bulbo.

Las plántulas obtenidas germinaron de embriones somáticos cuatro semanas después de colocar el callo embriogénico en el medio R-2, haciéndose visible la parte aérea de los embriones en germinación (**Fig. 25a**). El desarrollo de las primeras plántulas tuvo lugar en los primeros dos meses, alcanzando hasta 3 cm de altura durante este periodo (**Fig. 25b**). Entre el primero y el segundo mes aún se observó la compactación del callo, dando lugar a la formación de embriones en etapa globular (**Fig. 25c**). En este mismo periodo, se observó un incremento de embriones en germinación y se visualizaron plántulas incipientes, observándose algunos cúmulos de callo con mayor número de embriones en germinación (**Fig. 25d**) y otros en los que aparentemente no se presentó respuesta morfogénica. Transcurridos tres meses, se comenzó a observar un ligero ensanchamiento en la base de las plántulas formadas (**Fig. 25e**) y un cambio en la pigmentación, tomando un tono moteado. Así mismo, comenzaron a producirse hojas envainadoras (**Fig. 25f**), lo cual coincide con los cambios morfológicos descritos por el grupo de Mujica (2008) para la primera etapa de la formación del bulbo.

Como antecedente esta el trabajo de Mujica y Mogollón (2004), en el cual determinaron el efecto que tienen tres citoquininas en combinación con tres concentraciones de sacarosa en la bulbificación *in vitro*; y el trabajo del mismo Mujica con sus colaboradores (2008), en el cual retomaron los mejores resultados de su estudio anterior para documentar el comportamiento morfológico e histológico que ocurre en el proceso de bulbificación *in vitro* en ajos de tipo morado. En esta estudio no se modificó la concentración de sacarosa como lo hizo el grupo de Mujica (2008), es decir, se matuvo la concentración de sacarosa al 3%.

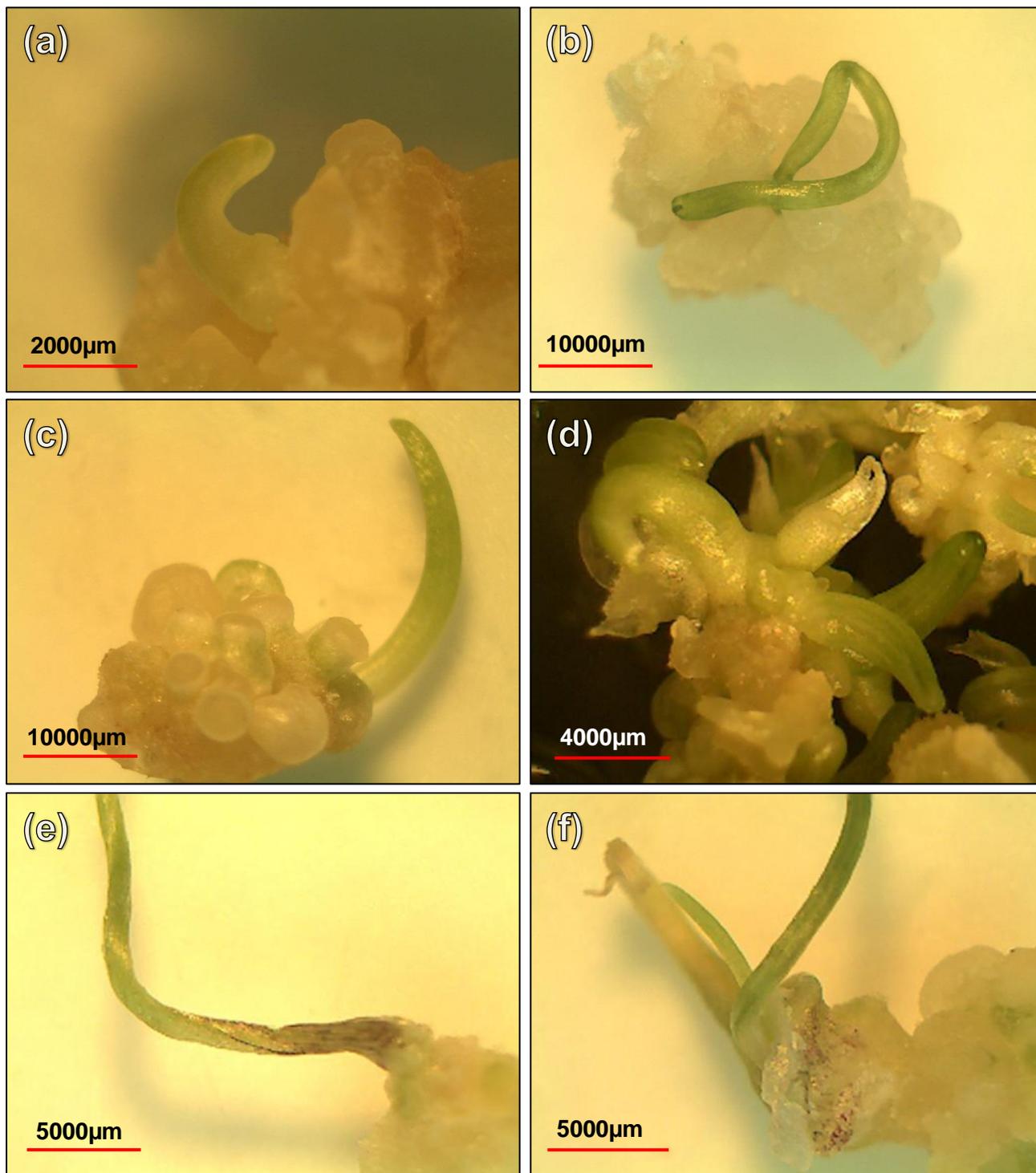


Figura 25. Etapa I de desarrollo del bulbo de ajo, var. Blanca en el medio R-2. (a) Formación de brotes incipientes. (b) Elongación de brotes generados. (c) Brote generado junto con estructuras globulares. (d) Alta generación de brotes en cúmulo de callo. (e) Pigmentación moteada y ensanchamiento en base de brote. (f) Formación de hojas envainadoras.

La segunda etapa de desarrollo del bulbo de ajo descrita por el grupo de Mujica (2008) corresponde al llenado y maduración del bulbo (**Fig. 26 y 27**). Entre tercer y cuarto mes se generalizó el engrosamiento de la base de las plántulas formadas y comenzaron a observarse bulbos piriformes con estructuras radiculares incipientes (**Fig. 26a**). Mujica menciona que el llenado de los bulbos se produce por la acumulación de fotoasimilados y nutrientes en las hojas envainadoras, lo cual contribuye a su engrosamiento. En este periodo de tiempo se continuó observando la producción de hojas envainadoras (**Fig. 26b**) y se alargaron las raíces, con lo cual se podría presumir la consolidación del meristemo apical como un disco basal propiamente dicho.

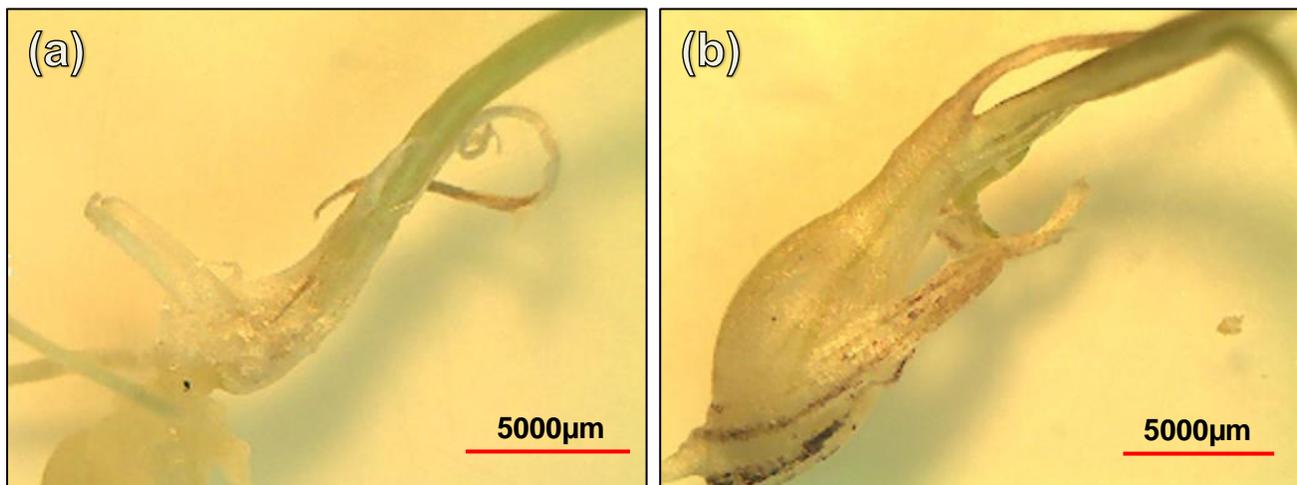


Figura 26. Etapa II de desarrollo del bulbo de ajo, var. Blanca en el medio R-2. (a) Formación de bulbos piriformes. (b) Producción de hojas envainadoras.

Entre el cuarto y quinto mes los bulbos se continuaron engrosando y su superficie tomó una tonalidad lustrosa (**Fig. 27a**). Además, se desarrollaron las yemas, lo cual se manifestó con la proliferación de bulbos (**Fig. 27b, c**).

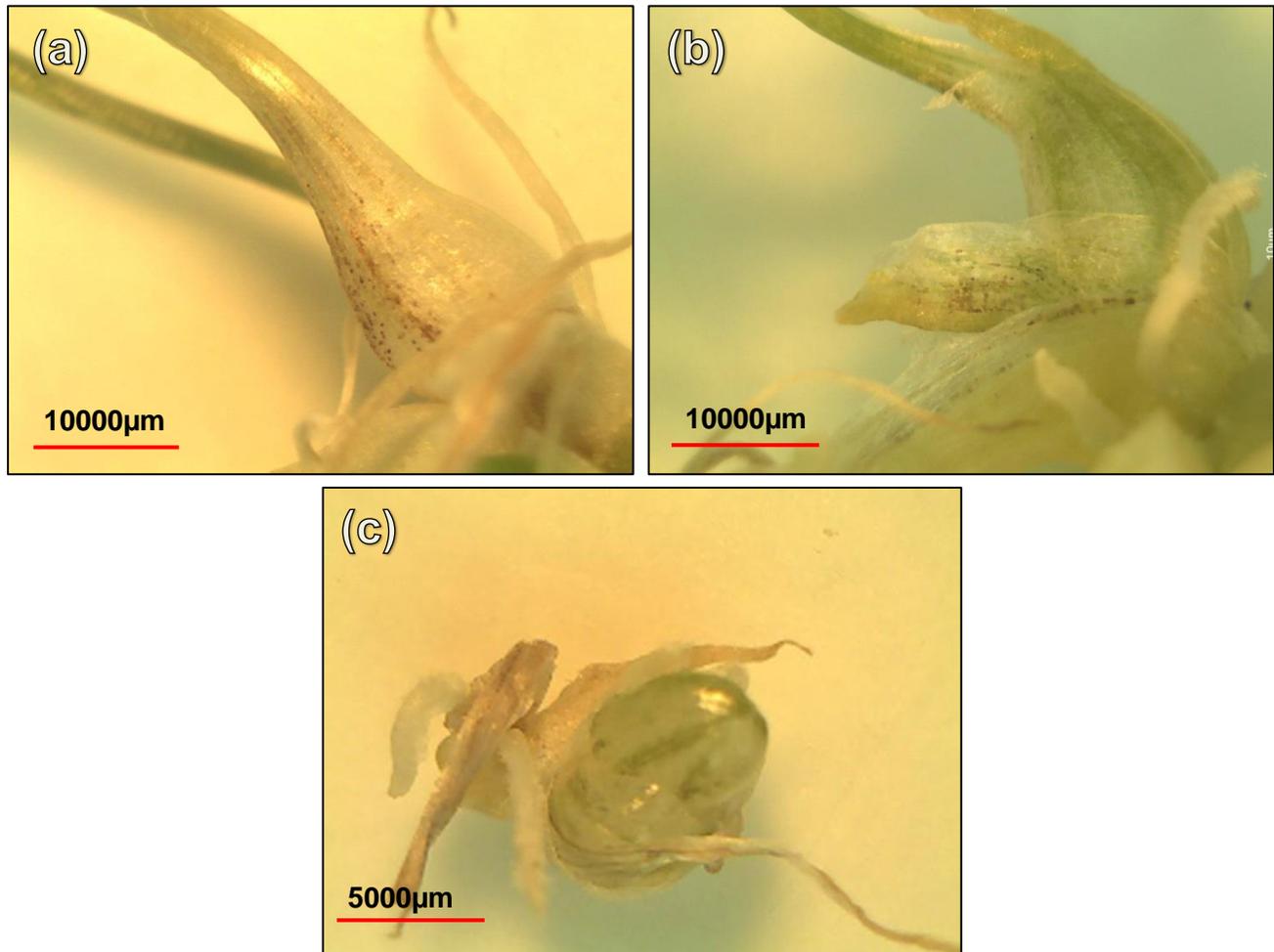


Figura 27. Etapa II de desarrollo del bulbo de ajo, var. Blanca en el medio R-2. (a) Engrosamiento de bulbos y cambio a tonalidad lustre. (b) Formación de bulbos. (c) Bulbo individual sin brotes.

VII. Conclusiones

- Se logró disminuir el nivel de contaminación en los explantes de las cuatro variedades de ajo, haciendo hincapié en la desinfección del disco basal con una segunda desinfección en una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 10 minutos y usando una solución antioxidante para disminuir la oxidación del tejido.
- La inducción de callo se logró en el medio I-A, el cual contiene $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, además de aportar la mayor cantidad de fuentes de nitrógeno en comparación con los otros medios de inducción.
- El aporte de nitrógeno por parte del medio de cultivo, en conjunto con los RCV son determinantes en la inducción de callo embriogénico.
- La cinética de crecimiento mostró que el callo no tiene dificultad para adaptarse al medio de cultivo después de ser subcultivado en ninguna de las variedades, observándose la mayor proliferación en las variedades Blanca y Morado, mientras que las variedades Chilena y Jaspeada mostraron una proliferación discreta, aumentando el 40% de peso fresco.
- La fase lineal es la de mayor duración en la cinética de crecimiento de las cuatro variedades evaluadas, durando entre 13 y 18 días.
- Se consiguió la mayor cantidad de protoplastos con la combinación de celulasa onozuko R10 (2%) y macerocima R10 (0.5%) del tratamiento P-III con 16 horas de exposición a la solución enzimática.
- El tratamiento que mostró los mejores resultados en la regeneración de plántulas fue el medio R-2, el cual contiene sales MS al 50%, coctel 20 al 50%, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de adenina, $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de prolina y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de caseína hidrolizada.
- La variedad Chilena generó la mayor cantidad de plántulas, logrando 29.2 por gramo de callo, mientras que la variedad Blanca generó 9.4 plántulas y las variedades “Morada” y “Jaspeada” presentaron la menor cantidad de plántulas generadas con tan solo 1 por gramo de callo.
- Bajo las condiciones establecidas en el presente estudio es posible obtener callo con características embriogénicas de las variedades Blanca, Morada

Chilena y Jaspeada, además de lograr la regeneración de plantas libres de patógenos, regenerándose hasta 29 plántulas por gramo de callo en tres meses, por lo cual se podría afirmar que el protocolo es eficiente.

VIII. Bibliografía

- Abo El-Nil, M. (1977). Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Science Letters*. 9:259-264.
- Acosta, G., Lujan, M. & Parra, R. (2008). Crecimiento y rendimiento de cultivares de ajo en Delicias, Chihuahua, México. *Agricultura Técnica en México*, Vol. 34, Núm. 2:177-188.
- Alvarado, M., Moreno, A. & Martínez, M., (2001). Obtención de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de patógenos. Web: https://www.researchgate.net/publication/228983049_Obtencion_de_semilla_de_ajo_Allium_sativum_L_libre_de_patogenos.
- Ayabe, M. & Sumi, S. (1998). Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 17(10): 773-779.
- Ayabe, M. & Sumi, S. (2001). A novel and efficient tissue culture method – "stem-disc dome culture" – for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 20(61): 503-507.
- Ayabe, M., Taniguchi, K. & Sumi, S. (1995). Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 15(1): 17-21.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 153-157.
- Barandiaran, X., Martín, N., Rodríguez, M., Di Pietro, A. & Martín, J. (1999). Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium Sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 18(5): 434-437.
- Bayer, (s. f.). Pudrición blanca, amarillez, marchitez foliar, tizón. Web: <http://www.cropscience.bayer.cl/soluciones/fichaproblema.asp?id=95>. (Consultado el 16 de Mayo 2016).
- Bhojawani, S. & Dantu, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An introductory text*. Nueva Delhi, India: Springer. Pp. 27-34,63-67,75-80, 127-132.

- Brenes, J. & Guillén, A. (2014). Establecimiento de un protocolo *In vitro* para el cultivo del ajo (*Allium sativum*) en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*. 27(4): 49-57.
- Burba, J. (2009). Mejoramiento genético y producción de “semilla” de ajo (*Allium sativum* L.). Posibilidades de adaptación a diferentes ambientes. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 3(1): 28-44.
- Davey, M., Anthony, P., Patel, D. & Power, J. (2010). Plant Protoplasts: isolation, culture and plant regeneration. En: Davey, M. & Anthony, P. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Cap. 9, Pp. 153-159. Loughborough, UK: Wiley-Blackwell.
- De la Cruz, J. & Garcia H. (2007). *Garlic: Post-Harvest Operations*. Veracruz: Danilo Mejía, PhD - Agricultural and Food Engineering Technologies Service (AGST). <http://www.fao.org/3/a-av002e.pdf>
- DUCHEFA-BIOCHEMIE. (2017). CELLULASE R-10. <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/C8001> (Consultado 26/03/2017).
- Duclercq, J., Sangwan, B., Catterou, M. & Sangwan, R. (2011). *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends in Plant Science*. Elsevier, 16(11): 597-606.
- Elhiti, M. & Stasolla, C. (2012). *In vitro* shoot organogenesis and hormone response are affected by the altered levels of *Brassica napus* meristem genes. *Plant Science*, 190: 40– 51.
- FAO. (2014). Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic and Social Department: The Statistical Division. <http://faostat3.fao.org/>
- Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S., Triaire, D., Arnault, I., Auger, J. & Kahane, R. (2005). Establishment of embryogenic cell suspension cultures of garlic (*Allium sativum* L.), plant regeneration and biochemical analyses. *Plant Cell Reports*. 24: 319-325.
- Gamborg, O. & Shyluk, J. (1970). The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiology*. 45(5): 598-600.
- Gantait, S., Mandal, N. & Das, P. (2010). An overview on *In vitro* culture of genus *Allium*. *American Journal of Plant Physiology*. 5(6): 325-337.

- George, E. (2008). Plant Tissue Culture Procedure - Background. En: George, E., Hall, M. & De Klerk, G. Plant Propagation by tissue culture. 3rd edition. Netherland: Springer. Pp. 6-9.
- George, E. & De Klerk, G. (2008). The components of plant tissue culture media I: macro- and micro- nutrients. En George, E., Hall, M. & De Klerk, G. Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Springer, pp. 65-113.
- Grabowski, M. (s. f.). Stem and bulb nematode in garlic. Web: <http://www.extension.umn.edu/garden/yard-garden/vegetables/stem-and-bulb-nematode-in-garlic/>. (Consultado 5 de Febrero 2016).
- Grosser, J., Clalovic, M. & Louzada, S. (2010). Protoplast fusion technology – somatic hybridization and cybridization. En: Davey M. & Anthony, P. Plant cell culture essential methods. 1st ed. UK: Wiley-Blackwell. 153-171.
- Haider, S., Hossain, M., Rahman, S., Sultana, S., Quddus, T., Chakraborti, M., Hoque, A., Shahriar, M. & Haque, A. (2015). *In vitro* plantlet regeneration of four local garlic (*Allium sativum*) accessions of Bangladesh. *British Biotechnology Journal*, 8(3): 1-12.
- Halperin, W. & Wetherell, D. (1965). Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature*. 205: 519-520.
- Hassan, M., Haque, M., Hassan, M. & Haque, M. (2014). An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tips as explant. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 12(1): 1-6.
- Hernández, A., Cepeda, M., Gallegos, G., Chacón, J., Ordaz, S. & González, A. (2015). Actividad nematocida de productos orgánicos comerciales, contra *Ditylenchus dipsaci* (Tylenchida: Anguinidae) bajo condiciones de laboratorio. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*. (11): 2247-2252.
- Herrera, S., Herrera, M., García, R., Gomora, R. & Rogel, G. (2013). Efecto del ácido ascórbico sobre crecimiento, pigmentos fotosintéticos y actividad peroxidasa de plantas de rosal. *Terra Latinoamericana*. 31(3): 193-199.

- Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G. & Jain, S. (2010). Plant Micropropagation. En: Davey, M. & Anthony, P. *Plant Tissue Culture, essential methods*. Loughborough, UK: Wiley-Blackwell. Pp.1-23.
- Izquierdo, H. (2006). Instructivo técnico para la producción de ajo-semilla de alta calidad fitosanitaria mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. *Temas de ciencia y Tecnología*, 10: 63-71.
- Izquierdo, H. & Quiones, Y. (2001). Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. *Temas de ciencia y Tecnología*, Pp. 39-55.
- Kahane, R., Rancillac, M. & de la Serve, B. (1992). Long-term multiplication of onion (*Allium Cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28(3): 281-288.
- Lagunes, E., Robledo, A., Gutiérrez, M., Mascorro, J. & Espitia, E. (2013). Genetic transformation of garlic (*Allium sativum* L.) with tobacco chitinase and glucanase genes for tolerance to the fungus *Sclerotium cepivorum*. *African Journal of Biotechnology*, 12(22): 3482-3492.
- Lee, S., Kim, H., Kim, Y., Park, N. & Park, S. (2009). Plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) via somatic embryogenesis. *Scientific Research and Essay*. 4(13): 1569-1574.
- Lim, T. (2015). Edible medicinal and non medicinal plants: Volume 9, modified stems, roots, bulbs. Netherlands: Springer. Pp. 210-215.
- Luciani, G., Marinangeli, P. & Curvetto, N. (2001). Increasing nitrate/ammonium ratio for improvement of garlic micropropagation. *Scientia Horticulturae*. 87: 11-20.
- Machakova, I., Zazimalova, E. & George, E. (2008). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. En: George, E., Hall M. & De Klerk, G. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. UK: Springer. Pp.175-179.
- Magyar, K., Dobránszki, J., Teixeira, J., Bulley, S. & Hudák, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in Apple. *Plant cell, tissue and organ culture*. 101(3):251-267.

- Martín, N., Garrido, J., Martín, J. & Barandiaran, X. (2004). Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one-step *In vitro* system. *Plant Cell Reports*. 22(10): 721-724.
- Matkowski, A. (2008). Plant *In vitro* culture for the production of antioxidants - a review. *Biotechnology Advances*. 26(6): 548-560.
- Mroginski, L., Sansberro, P. & Flaschland, E. (2010). Establecimiento De Cultivo De Tejidos Vegetales. En: *Biotecnología Y Mejoramiento Vegetal II*. Levitus *et. a.*, 2nd ed. Argentina: INTA. Pp. 17-25.
- Mroginski, L. & Roca, W. (1993). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, fundamentos y aplicaciones*. Colombia: CIAT. 19-40.
- Mujica, H. & Mogollón, N. (2004). Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*. 16(1): 55-60.
- Mujica, H., Sanabria, M., Mogollón, N. & Perozo, Y. (2008). Formación *in vitro* del bulbo del ajo morado (*Allium sativum* L.). *Revista de la facultad de agronomía*, 25: 197-210.
- Murashige, T., & F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497.
- Ozawa, S., Yasutani, I., Fukuda, H., Komamine, A. & Sugiyama, M. (1999). Organogenic responses in tissue culture of srd mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 125: 135-142.
- Park, J., Park, S. & Craven J. (2013). Protoplast Isolation and Fusion. En: Smith, R. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Cap. 13, Pp. 147-154. London, UK: Elsevier.
- Park, M., Yi, N., Lee, H., Kim, Z., Kim, M., Park, J., Kim, J., Lee, J., Cheong, J. & Choi, Y. (2002). Generation of chlorsulfuron resistant transgenic garlic plant (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *Molecular Breeding*. 9: 171-181.

- Pérez, L., Palemón, E., Ayvar, S. & Cevallos, E. (2005). Adaptación de cultivares de ajo morado y blanco (*Allium sativum* L.) en Acatlán, Guerrero, México. *Acta Universitaria*, 15(1): 55-65.
- Pérez, J. (2010). Evaluación de la producción de fitoquímicos a partir de cultivos de células en suspensión de *Nerium oleander*. Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
- Pérez, L., Navarro, M., Ramírez, R. & Mendoza, B. (2010). Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de fitopatología*, 28(2): 97-110.
- Prado, A., Luna, F. & Hernández, N. (2011). Regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. *Bioagro*, 23(3): 207-214.
- Quiroz, F., Rojas, R., Galaz, R. & Loyola, V. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 285-301. Springer.
- Rader, H. & McGuinness, J. (2016). Growing garlic in Alaska. Web: <https://www.uaf.edu/ces/garlic/#sthash.d6MKieSO.dpbs>. (Consultado 16 Junio 2016).
- Radice, S. (2010). Morfogénesis. En: Levitus *et. al.* Biotecnología y mejoramiento vegetal II. 2nd ed. Argentina: INTA. Pp. 26-32
- Raggio, M. & Mora, N. (2008). Morphological and genetic characteristics allow the identification of a collection of garlic cultivar in the north-central region of Mexico. *International Journal of Experimental Botany*, (77): 81-91.
- Reveles, M., Velásquez, R. & Bravo, A. (2009). Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. Libro Técnico No. 11. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP. Pp. 272.
- Rivera, M. & Jadán, M. (2013). Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de Babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). *Revista EÍDOS*. Pp. 5-9.

- Robledo, A., Villalobos, V. & Jofre, A. (2000). Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 36(5): 416-419.
- Robledo, A., Cabrera, J., Villalobos, V., Herrera, L. & Jofre, A. (2004). Genetic transformation of garlic (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *HORTSCIENCE*, 39(6): 1208-1211.
- Robledo, A. & Tovar, H. (2012). Biotechnological tools for garlic propagation and improvement. *Innovation in biotechnology*, Dr. Eddy C. Agbo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0096-6, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/innovations-in-biotechnology/biotechnological-tools-for-garlic-propagation-and-improvement>
- Robledo, A. & Villalobos, V. (2013). Ajo. Estudio FAO producción y protección vegetal 195: Material de propagación de calidad declarada/Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente. SAGARPA, México. Pp.140.
- SAGARPA. (2014). Sistema de Información Agroalimentaria. <http://www.siap.gob.mx/>
- Sata, S., Bagatharia, S. & Thaker, V. (2001). Induction of direct somatic embryogenesis in garlic (*Allium sativum*). *Methods in cell science*. 22: 299-304.
- Sawehel, W. (2002). Stable genetic transformation of garlic planting using particle bombardment. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 7: 49-59.
- Scotton, D., Benedito, V., Molfetta, J., Rodrigues, B., Tulmann, A. & Figueroa, A. (2013). Response of root explants to *in vitro* cultivation of marketable garlic cultivars. *Horticultura Brasileira*. 31: 80-85.
- SIGMA-ALDRICH. (2017). Pectinase from *Rhizopus* sp. Estados Unidos: Sigma-Aldrich Co. LLC. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p2401?lang=es®ion=MX> (Consultado 25/03/2017).
- Smith, R. (2013). Regeneration and morphogenesis. En: Smith, R. Plant tissue culture, techniques and experiments. 3rd edition. Elsevier. Pp. 82-90.

- Solís, L., Andrade, A., Sáenz, L. Oropeza, C. & Castaño, E. (2012). Somatic embryogenesis in recalcitrant plants. Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/embryogenesis/somatic-embryogenesis-in-recalcitrant-plants>
- Song, S., Cheong, J. & Choi, Y. (2007). Onion, garlic and related species. En: Transgenic Crops IV. Verlag Berlin Heidelberg: Springer. 59: 415-433.
- Sugiyama, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:61–64.
- Szabados, L. (1993). Protoplastos: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. En Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cap. 10, pp. 240-254. Cali, Colombia: CIAT.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2015). Plant physiology and development. 5th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Pp. 339-345.
- Thorpe, T. (1993). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. *Morphogenesis in Plants*. Springer.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E., de Kerk, G., Roberts, A. & George, E. (2008). The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. En: George, E., Hall, M. & de Klerk, G. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. UK: Springer, 118-119.
- Thorpe, T. (2013). History of plant cell culture. En: Smith, R. Plant tissue culture: techniques and experiments. Amsterdam: Elsevier. Cap. 1, Pp. 1-22.
- USDA. 2015a. Taxonomy - GRIN-Global Web V 1.9.8.2. Npgsweb.ars-grin.gov. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?2368>
- USDA. 2015b. Plants profile for *Allium sativum* (cultivated garlic). Plants.usda.gov. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ALSA2>
- Van Staden, J., Zazimalova, E. & George, E. (2008). Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. En: George, E., Hall, M. and de Klerk, G. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. UK: Springer. Pp. 209-217.

- Von Arnold, S. Somatic embryogenesis. (2008). En: George, E., Hall, M. & de Klerk, G. Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. UK: Springer. 335-354.
- White, P. (1943). Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for cultivation of excised tomato roots. *Growth*. 7: 53-65.
- White, P. (1963). The cultivation of animal and plant cells. 2nd edition. Ronald Press, New York.
- YAKULT. (s.f.). Products information for laboratory. Japón: YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO., LTD. <http://www.yakult.co.jp/yipi/en/product.html> (consultado el 26/03/2017).
- Yamashita, K., Hisatsune, Y., Sakamoto, T., Ishizuka, K. & Tashiro, Y. (2002). Chromosome and cytoplasm analyses of somatic hybrids between onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*A. sativum* L.). *Euphytica*, 125:163-167.
- Yang, X., Lü, J., Teixeira, A. & Ma, G. (2012). Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 109: 213–221.
- Zheng, S-J., Kamenetsky, R., Féréol, L., Barandiran, X., Rabinowitch, H., Chevelon, V. & Kik, C. (2007). Garlic Breeding System Innovations. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 1(1): 6-15.
- Ziv, M. & Chen, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. En: George, E., Hall, M. & de Klerk, G. (2008). Plant propagation by tissue culture. 3rd ed. UK: Springer. Pp. 465-475.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición de la formulación de sales Murashige y Skoog (1962).

La formulación de sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) es la más ampliamente usada (**Cuadro 15**). Presenta como característica distintiva su alto contenido de nitrato, potasio y amonio en comparación a otras formulaciones de sales (George & de Klerk, 2008; Smith, 2013).

Cuadro 15. Composición de la formulación de sales MS (1962)

Componentes		Cantidad mg L ⁻¹
Nitrato de potasio..... (KNO ₃)		1,900
Nitrato de amonio..... (NH ₄ NO ₃)		1,650
Sulfato de magnesio..... (MgSO ₄ ·7H ₂ O)		370
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
Sulfato de zinc..... (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)		8.6
Sulfato de cobre..... (CuSO ₄ ·5H ₂ O)		0.025
Cloruro de calcio..... (CaCl ₂ ·2H ₂ O)		440
Yoduro de potasio..... (KI)		0.83
Cloruro de cobalto..... (CoCl ₂ ·6H ₂ O)		0.025
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	192.48
	KH ₂ PO ₄	170
	K ₂ HPO ₄	217.60
Ácido Bórico..... (H ₃ BO ₃)		6.2
Molibdato de sodio..... (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)		0.25
Sulfato ferroso..... (FeSO ₄ ·7H ₂ O)		27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		37.3

ANEXO 2. Soluciones concentradas MS (Murashigue & Skoog, 1962).

Cuadro 16. Soluciones concentradas (100X) del medio conocido como MS (1962)

COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	500 mL (g)	250 mL (g)	100 mL (g)	50 mL (g)
Solución I: NITRATOS						
Nitrato de Potasio	KNO ₃	190	95	47.5	19	9.5
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	165	82.5	41.25	16.5	8.25
Solución II: SULFATOS						
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	37	18.5	9.25	3.7	1.85
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	2.23	1.115	0.5575	0.223	0.1115
	MnSO ₄ .H ₂ O	1.69	0.845	0.4225	0.169	0.0845
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.86	0.43	0.215	0.086	0.043
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	0.00125	0.000625	0.00025	0.000125
Solución III: HALÓGENOS						
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	44	22	11	4.4	2.2
	CaCl ₂ .H ₂ O	38.5	19.25	9.625	3.85	1.925
	CaCl ₂	33.2	16.6	8.3	3.32	1.66
Yoduro de Potasio	KI	0.083	0.0415	0.02075	0.0083	0.00415
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	0.00125	0.000625	0.00025	0.000125
Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO						
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	19.248	9.624	4.812	1.9248	0.9624
	KH ₂ PO ₄	17	8.5	4.25	1.7	0.85
	K ₂ HPO ₄	21.76	10.88	5.44	2.176	1.088
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.62	0.31	0.155	0.062	0.031
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	0.0125	0.00625	0.0025	0.00125
Solución V: QUELANTES						
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.784	1.392	0.696	0.2784	0.1392
Na2EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	3.36	1.68	0.84	0.336	0.168
Na2EDTA.2H2O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	3.724	1.862	0.931	0.3724	0.1862

*De una solución concentrada de 0.025 g en 100 mL (de CuSO₄ o de CoCl₂) tomar una alícuota de:

- 0.5 mL para preparar solución madre 100x de un volumen de 50mL
- 1 mL para preparar solución madre 100x de un volumen de 100mL
- 2.5 mL para preparar solución madre 100x de un volumen de 250mL

ANEXO 3. Vitaminas

Vitaminas R2

Las vitaminas más frecuentemente usadas en CTV son tiamina (B₁), ácido nicotínico (B₃) y piridoxina (B₆), las cuales tienen funciones catalíticas en reacciones enzimáticas y son agregadas al medio de cultivo para mejorar la respuesta celular. La tiamina en la forma de tiamina pirofosfato (TPP), es un

Cuadro 17. Formulaciones vitamínicas

Composición de formulaciones vitamínicas mg·L ⁻¹			
	White ^a	B5 ^b	MS ^c
Tiamina	0.1	10.0	0.1
ácido nicotínico	0.5	1.0	0.5
Piridoxina	0.1	1.0	0.5
Myo-inositol		100	100

^aWhite (1963, 1943)
^bB5 Gamborg (Gamborg *et al.*, 1976)
^cMurashige and skoog (1962)

cofactor esencial en el metabolismo de carbohidratos y está directamente involucrado en la biosíntesis de algunos aminoácidos. Además de las vitaminas del complejo B, se adiciona *Myo*-inositol por su importancia en la transducción de señales (Bhojawani & Dantu, 2013; Smith, 2013).

Las principales formulaciones vitamínicas son: White (1963, 1943), B5 (Gamborg *et al.*, 1976) y MS (1962) y se muestran en el **Cuadro 17**.

Las vitaminas R2 son una modificación de las vitaminas MS, su contenido se muestra a continuación en el **Cuadro 18**.

Cuadro 18. Vitaminas R2

Composición de Vitaminas R2 (MS modificado) mg·L ⁻¹		
	Fórmula	Cantidad
Tiamina	C ₈ H ₁₇ N ₄ O ₅ Cl·HCl	2
ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	1
Piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO·HCl	1
Myo-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100

Coctel 20

El coctel 20 está compuesto por vitaminas del complejo B y aminoácidos. Es empleado para mejorar la respuesta morfogenica buscada. El coctel 20 está en proceso de ser patentado, por tal motivo no se especifica su composición.

ANEXO 4. Solución antioxidante

Los efectos abrasivos de los agentes desinfectantes aplicados en el establecimiento de un cultivo *in vitro*, aunado a los cortes y lesiones que sufre el explante, pueden desencadenar el estrés oxidativo. Con el fin de retrasar, o en el mejor de los casos inhibir la oxidación de un tejido suele emplearse un antioxidante (Matkowski, 2008; Azofeifa, 2009).

En el presente estudio se empleó una solución antioxidante, la cual contenía 100 mg ácido ascórbico y 100 mg ácido cítrico en un litro de solución. El ácido cítrico es un antioxidante, agente neutralizador y buffer. Por su parte, el ácido ascórbico (vitamina C) es quizás el antioxidante no enzimático más importante en las plantas, participa en la defensa contra el estrés oxidativo biótico y abiótico. En conjunto esta combinación de antioxidantes se usa durante la disección del explante para prevenir el ennegrecimiento de tejido, es decir, la oxidación (Thorpe *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2013).