

VIUSID Agro® EN LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL AJO (*Allium sativum* L.)

Diosdada Galvez Guerra*, Sergio Juan Rodríguez Morales, Kenisleidy Dominguez Vazquez, Ania Robaina Jiménez y Adrián Rubio Cabrera

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, CP: 53 000, Villa Clara, Cuba.

*Autora para la correspondencia: propag.biotec@inivit.cu.

RESUMEN

En Cuba, la producción de ajo tiene un bajo índice de productividad, el cual es afectado por la presencia de virus en sus bulbos. La gran disminución en la formación de bulbos y los bajos rendimientos de los mismos, han motivado que el país valore la idea de importar semillas con mayor calidad fisiológica. El cultivo *in vitro* ofrece la posibilidad de multiplicar material vegetal sano y así, introducir en la agricultura semilla de alta calidad, para contrarrestar estas afectaciones de los virus y otras enfermedades. Por tanto, se requiere de la búsqueda de alternativas, para incrementar los índices de multiplicación del material de partida. Se ajustó el protocolo de desinfección del material vegetal, para disminuir las contaminaciones microbianas en el establecimiento *in vitro*. Fue posible el establecimiento y multiplicación *in vitro* del ajo, con la adición al medio de cultivo de VIUSID Agro®, en concentraciones de 2,0 y 2,5 mL.L⁻¹ respectivamente. Se determinó el efecto positivo de este producto con (2,5 mL.L⁻¹) en la bulbificación *in vitro* del cultivo, por lo que se recomienda utilizarlo en la propagación *in vitro* y escalar los resultados alcanzados, para establecer plantaciones en campo y evaluar su comportamiento, respecto a lo que se utiliza en la producción actual.

Palabras clave: bulbos, calidad, desinfección.

VIUSID Agro® IN THE *IN VITRO* PROPAGATION OF GARLIC (*Allium sativum* L.)

ABSTRACT

In Cuba, garlic production has a low productivity rate, which is affected by the presence of viruses in its bulbs. The great decrease in the formation of bulbs and their low yields, have motivated that the country values the idea of importing seeds with a greater physiological quality. *In vitro* cultivation offers the possibility of multiplying healthy planting material and thus, to introduce high quality seed into agriculture to counteract these effects of viruses and other diseases. Therefore, the search for alternatives is required to increase the multiplication rates of the starting material. The disinfection protocol for plant material was adjusted to reduce microbial contamination in the *in vitro* establishment. It was possible the *in vitro* establishment and multiplication of garlic, with the addition of VIUSID Agro® to the culture medium, in concentrations of 2,0 and 2,5 mL.L⁻¹ respectively. It was determined the positive effect of this product with (2,5 mL.L⁻¹) in the *in vitro* bulbification of the culture, so it is recommended to use it in the *in vitro*

propagation and escalate the results reached, to establish plantations in field and evaluate its behavior, with respect to what is used in the current production.

Keywords: bulbs, quality, disinfection.

INTRODUCCIÓN

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

Las hojas son alargadas, planas y envainadoras; las flores de color rosado o verde y no producen semillas. El falso tallo es blando, liso y de hasta 40 cm. de longitud, de donde nacen bulbillos aéreos.

El sistema radical consta de numerosas raíces adventicias simples, delgadas y poco ramificadas que crecen superficiales en el suelo. Las especies de este género presentan el mismo patrón básico de crecimiento apical, tanto en la raíz como en el tallo y la frecuencia de ramificación del brote apical varía con la especie, el cultivar y las condiciones de crecimiento (Brewster, 1994).

El ajo se afecta por complejos de virus que contaminan la semilla y reducen sus rendimientos. Keller y Fritsch (1997) afirman que prácticamente toda la semilla de este cultivo se infesta por un complejo viral en mayor o menor grado.

Los síntomas de la enfermedad son visibles en forma de mosaico o estrías amarillas en las hojas, que causan disminución en la productividad de los bulbos lo que depende de la variedad y la cantidad de virus presente en la semilla.

En Cuba la producción de ajo consta de un bajo índice de productividad, el cual es afectado por la presencia de virus en sus bulbos. La gran disminución en la formación de bulbos y los bajos rendimientos de los mismos han motivado que nuestro país valore la idea de importar semillas con mayor calidad fisiológica desde México.

Teniendo en cuenta que no se dispone de una metodología para la propagación *in vitro* del cultivo del ajo, el presente trabajo se realizó con el objetivo de estudiar las etapas desde el establecimiento hasta la bulbificación *in vitro* que permiten la obtención de material vegetal con calidad fitosanitaria.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT); donde se utilizó como material vegetal meristemas de ajo del cultivar 'Blanco'. Para el desarrollo de los experimentos, se empleó como medio de cultivo basal, compuesto por las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS). El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,7 con NaOH 0,5 mol. L⁻¹ y HCl 0,5 mol. L⁻¹ antes de la esterilización en autoclave. Los medios de cultivo y sistemas de cultivos que se emplearon en los experimentos se esterilizaron por vapor en autoclave vertical (BK-75) a 121°C y 1,20 kg.cm⁻².

Influencia del manejo de la desinfección del material vegetal

Para la desinfección de los bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) a establecer *in vitro*, se utilizaron cuatro tratamientos.

Tratamientos:

1. Inmersión en etanol (70 %) + inmersión en NaClO (3,0 %) durante 20 minutos.
2. Inmersión en NaClO (3,0 %) durante 20 minutos.
3. Inmersión en etanol (70 %) + inmersión en NaClO (3,0 %) durante 25 minutos.
4. Inmersión en NaClO (3,0 %) durante 25 minutos.

A los siete días de cultivo se contabilizó el número de tubos de ensayos contaminados por bacterias y hongos, así como el número de explantes muertos y se expresó el resultado final en porcentaje (%). Este experimento tuvo cinco repeticiones por tratamientos.

Efecto del VIUSID Agro® en el desarrollo de los explantes para el establecimiento *in vitro*

Con el objetivo de retener el crecimiento de las hojas y aumentar el engrosamiento de los bulbos para que en la menor brevedad de tiempo puedan pasar a la fase de multiplicación, se evaluó la influencia de la concentración del VIUSID Agro® en el medio de cultivo en la fase de establecimiento.

Tratamientos:

1. Sales y vitaminas MS (Control)
2. Sales y vitaminas MS + 0,5 mL.L⁻¹
3. Sales y vitaminas MS + 1,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®
4. Sales y vitaminas MS + 1,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®
5. Sales y vitaminas MS + 2,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®
6. Sales y vitaminas MS + 2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®

Los dientes fueron desinfectados según la mejor variante obtenida en el experimento anterior. Se establecieron *in vitro* 50 meristemos por cada tratamiento, se estudiaron cinco variantes en el medio de cultivo. Se le añadió a cada tubo de ensayo 0,5 mL VIUSID Agro® cada siete días hasta los 21 días de establecido. Se evaluó a los 30 días el número de explantes que presentaban las características morfofisiológicas adecuadas para pasar a medio de cultivo de multiplicación. Este experimento tuvo cinco repeticiones por tratamientos.

Influencia de la concentración del VIUSID Agro® en el medio de cultivo para la fase multiplicación

Con el objetivo de estimular la brotación de las yemas axilares y la multiplicación de los explantes, se evaluó la combinación del de 6-BAP y VIUSID Agro® en el medio de cultivo para la fase de multiplicación. Se estudiaron tres tratamientos:

Tratamientos:

1. Sales y vitaminas MS, +5,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP mg.L⁻¹ (Control)
2. Sales y vitaminas MS + 5,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP +2,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®
3. Sales y vitaminas MS + 5,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP +2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®

Se le añadió a cada frasco de cultivo 0,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro® cada siete días hasta los 21 días a partir del momento de la siembra.

Los explantes utilizados procedían del mejor medio de cultivo obtenido en el establecimiento *in vitro*. Se utilizaron 50 explantes por tratamiento. Se colocaron dos explantes por frasco de cultivo.

Se evaluó a los 30 días de cultivo el coeficiente de multiplicación (CM), por cada tratamiento, al contabilizar el número total de explantes y dividirlos por el número inicial. Este experimento tuvo cinco repeticiones por tratamientos.

Efecto del VIUSID Agro® en la bulbificación *in vitro* en sistema de cultivo semi-automatizado

Con el objetivo de lograr la formación de bulbos con dientes se evaluó la combinación del 2ip + la sacarosa y VIUSID Agro® en el medio de cultivo semi-automatizado para la fase de bulbificación se estudiaron tres tratamientos:

1. Sales y vitaminas MS, +2,0 mg.L⁻¹ de 2ip + 90 g sacarosa (Control)
2. Sales y vitaminas MS + 2,0 mg.L⁻¹ de 2ip+90 g sacarosa +2,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®
3. Sales y vitaminas MS + 2,0 mg.L⁻¹ de 2ip+90 g sacarosa +2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®

En cada sistema de cultivo se colocaron 20 explantes y 1500 mL de medio de cultivo de bulbificación. Para el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) se empleó un tiempo de 15 minutos de inmersión y frecuencia de inmersión cada tres horas. Este experimento tuvo tres repeticiones por cada sistema de cultivo. Se evaluó a los 30 días de cultivo el coeficiente de bulbificación. Se le añadió a cada frasco 0,5 mL VIUSID Agro® cada siete días hasta los 21 días a partir del día de la siembra. Los explantes utilizados procedían del mejor tratamiento del experimento de establecimiento *in vitro*. Se utilizaron 20 explantes por tratamiento. Se evaluó a los 30 días de cultivo la formación de bulbo y aparición de flores por cada tratamiento. Este experimento tuvo tres repeticiones por tratamientos.

Análisis estadísticos

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS ver. 16.0, para el sistema operativo Windows. Cuando los datos cumplían el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza se realizaron análisis estadístico de varianza simple y se empleó la prueba de *Tukey* para $p \leq 0,05$. En caso contrario los datos fueron procesados mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para $p \leq 0,05$.

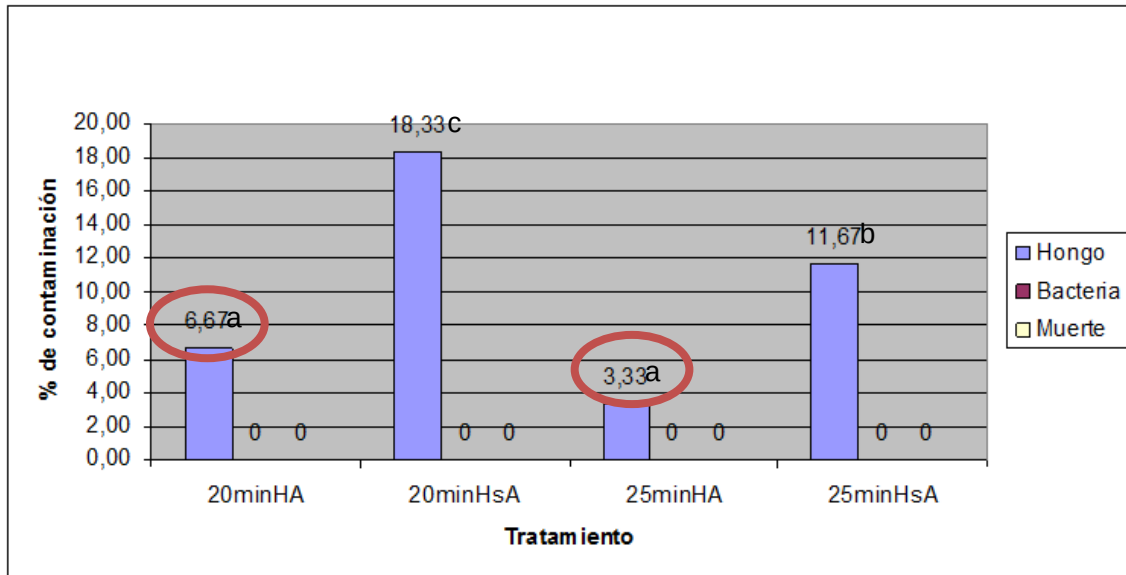
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del manejo de la desinfección del material vegetal

En la desinfección del material vegetal para el establecimiento *in vitro* se obtuvieron los mejores resultados con un 93,37 % de eficiencia cuando se empleó el etanol al 70 % y el hipoclorito de sodio al 3,0 %, durante 25 minutos (Figura 1 y 2). Estos resultados se corroboran por lo descrito por Calvo *et al.* (2007) donde plantea que el hipoclorito de sodio se ha utilizado tradicionalmente solo o en combinación con otros desinfectantes en la desinfección de los materiales vegetales a establecer *in vitro*, por su alto potencial redox 1,36 eV. En cada protocolo para el establecimiento *in vitro* de especies vegetales es necesario ajustar la concentración y el tiempo de exposición al mismo. Por lo general se han usado concentraciones desde 1,0 a 6,0 % y tiempos entre 10 y 30 minutos, en dependencia de las características morfológicas e higiénicas del material vegetal a establecer (Vilchez *et al.*, 2011; Galvez *et al.*, 2013).

Los resultados en cuanto a la desinfección del bulbo de ajo se corresponden con los descritos para el establecimiento *in vitro* de la malanga 'INIVIT MC-2001' (Galvez *et al.*,

2013). Estos autores emplearon el hipoclorito de sodio al 3,0 %, en un periodo de tiempo que varió de 10 a 35 minutos para la desinfección de las yemas brotadas de los cormos con una eficiencia del 85,38 % durante la etapa de establecimiento.



Rangos medios con letras no comunes en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para $p < 0,05$ ($n=150$).

Leyenda:

1. inmersión en etanol (70 %) + inmersión en NaClO (3,0 %) durante 20 minutos. 2 inmersión en NaClO (3,0 %) durante 20 minutos. 3 inmersión en etanol (70 %) + inmersión en NaClO (3,0 %) durante 25 minutos. 4 inmersión en NaClO (3,0 %) durante 25 minutos

Figura 1. Influencia del manejo de la desinfección del material vegetal sobre el número de explantes de ajo contaminados a los siete días de cultivo.



Figura 2. Brotes de ajo (*Allium sativum* L.) libres de contaminación a los siete días en el medio de cultivo de establecimiento *in vitro*.

Efecto del VIUSID Agro® en el desarrollo de los explantes para el establecimiento *in vitro*

Al analizar el efecto de la concentración del VIUSID Agro® en el medio de cultivo (tabla 1) se observó que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos estudiados. La adición del VIUSID Agro® en el medio de cultivo determinó el crecimiento de los meristemos durante la fase de establecimiento. Cuando se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS + 2,5 mL.L⁻¹ de VIUSID Agro® se logró que los 50 meristemos a los 30 días de establecidos presentaran la característica morfofisiológicas que les permitiera pasar al medio de cultivo de multiplicación en estado semisólido con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos.

Tabla 1. Influencia del VIUSID Agro® en el desarrollo de los explantes para el establecimiento *in vitro*.

Tratamientos	Altura de la planta (cm)	Perímetro del bulbo (cm)
Control	11,13 a	0,135 c
Tratamiento 1	6,75 b	0,150 b
Tratamiento 2	5,63 b	0,175 b
Tratamiento 3	4,90 c	0,187 b
Tratamiento 4	2,45 d	1,080 a
Tratamiento 5	2,18 d	1,120 a

Rangos medios con letras no comunes en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis/ Mann-Whitney para $p < 0,05$ ($n=150$)

Leyenda: Sales y vitaminas MS (Control) Sales y vitaminas MS + 0,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro® Sales y vitaminas MS + 1,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro® Sales y vitaminas MS + 1,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro® Sales y vitaminas MS + 2,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro® Sales y vitaminas MS + 2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®

A los 30 días de cultivo el 100 % de los explantes establecidos en el medio de cultivo de establecimiento *in vitro* compuesto por las sales y vitaminas MS, con 2,5 mL.L⁻¹ de VIUSID Agro® presentaban una coloración verde típica del clon, retención del crecimiento de las hojas y un buen engrosamiento en el bulbo (Figura 3). Explantes con estas características morfológicas permitieron que se les realizara con el bisturí una disección transversal para que pudieran ser colocados en el medio de cultivo de multiplicación.

En las demás variantes de medios de cultivo con diferentes concentraciones de VIUSID Agro® fue necesario esperar hasta los 36 días de cultivo, tiempo final de desarrollo del experimento de establecimiento *in vitro*, para que se lograra el mayor número de ápices por tratamiento listos para pasar a medio de cultivo de multiplicación, en el caso del testigo no hubo respuesta positiva.

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* del ajo no es necesario el empleo de citoquinina ya que su desarrollo es rápido, pero poco favorable por la presencia del alargamiento de las hojas y muy débil el bulbo, con el uso del VIUSID Agro® se obtuvo una respuesta positiva ya que se logró retener el alargamiento de las hojas y un mayor engrosamiento en el bulbo (Figura 3).



Control Tratamiento

Figura 3. Características morfológicas de los explantes de ajo (*Allium sativum* L.) a los 30 días de cultivo.

Simpson (2006) refiere que usualmente en los ápices, la citoquinina endógena es muy baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces por lo que la adición exógena de la misma en los medios de cultivo de establecimiento *in vitro* es esencial para el proceso de división celular. En estudios sobre la influencia de las hormonas en la síntesis del ADN y división celular se observó que aun cuando las auxinas eran necesarias para que hubiera mitosis y síntesis de ADN, la mitosis y citocinesis solo se producían cuando había niveles adecuados de citoquininas por la influencia que podrían ejercer sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y de proteínas (Jackson, 2005).

Efecto del VIUSID Agro® en el desarrollo de los explantes para la multiplicación *in vitro*

La concentración del VIUSID Agro® en el medio de cultivo influyó en el coeficiente de multiplicación de los explantes de ajo. Cuando se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS con 5,0 mg.L⁻¹ de 6-BAP y VIUSID Agro® se lograron a los 30 días de cultivo en la fase de multiplicación los mejores resultados, en cuanto al coeficiente de multiplicación de los explantes con diferencias significativas con el tratamiento control (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Efecto del VIUSID Agro® en el desarrollo de los brotes para la multiplicación *in vitro*.

Tratamientos	Diámetro del brote (cm)	Número de hijos
Control	0,14±0,02 b	1,60±0,56 b
Tratamiento 1	1,15±0,05 ab	2,80±0,78 a
Tratamiento 2	1,23±0,04 a	2,90±0,81 a

Medias con letras no comunes en una misma fila difieren según prueba de Tukey para $p < 0,05$

Leyenda: Sales y vitaminas MS, +5,0 mL.L⁻¹ de 6-BAP (Control) 1. Sales y vitaminas MS + 5,0 mL.L⁻¹ de 6-BAP +2,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®; 2. Sales y vitaminas MS + 5,0 mL.L⁻¹ de 6-BAP +2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®



Figura 4. Plantas *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) desarrolladas a los 30 días de cultivo.

El efecto de la adición del VIUSID Agro® en la multiplicación de los ápices tiene su explicación en que los meristemos de ajo poseen una concentración endógena de auxinas que combinada con la de 6-BAP exógena adicionada al medio de cultivo alcanza el adecuado balance de auxinas-citoquininas para estimular el crecimiento y la multiplicación de los mismos.

Estos resultados corroboran lo sugerido por George y Klerk (2008), quienes proponen que en el cultivo de tejidos las citoquininas son necesarias para la división celular en las plantas y en ausencia de ellas o en una relación desequilibrada entre ellas con la auxina ya sea por defecto o exceso, la metafase de la mitosis se prolonga y se detiene la división de los núcleos celulares en ciertos estadios del ciclo celular. Pero en el caso del cultivo del ajo es necesario de un estimulador del crecimiento como es el VIUSID Agro® que ayuda en el engrosamiento de los explantes y la retención de los alargamientos de las hojas de forma que permite un mejor ahijamiento.

En el incremento de los coeficientes de multiplicación, una posible explicación puede estar dada por las funciones en las plantas de la arginina y el triptófano como precursores de la síntesis endógena de la auxina Ácido-Indolacético (AIA) por los brotes *in vitro*, lo cual pudo anular o reducir el efecto depresivo de las altas concentraciones de citoquininas sobre la elongación de los brotes axilares y restablecer el crecimiento normal de los mismos (López, 2010).

Efecto del VIUSID Agro® en la bulbificación *in vitro* en sistema de cultivo semi-automatizado

El sistema de cultivo semiautomatizado influyó sobre el coeficiente de bulbificación, ya que se logró una renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo, el mayor coeficiente de bulbificación se obtuvo a los 30 días de cultivo con el uso del medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS, con 2,0 mg.L⁻¹ de 2ip, 90 g de sacarosa, 2,5 mL.L⁻¹ de VIUSID Agro® sin diferencias significativas con el tratamiento 1, pero sí con el control (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del VIUSID Agro® en la bulbificación *in vitro* del ajo en los sistemas de cultivo semi-automatizado.

Tratamientos	Diámetro de la planta (cm)	Número de bulbos	Número de flores
Control	5,50±0,24 b	1,00±0,02 b	0,00 b
Tratamiento 1	14,10±0,65 a	12,00±0,50 a	0,7±1,02 a
Tratamiento 2	13,60±0,69 a	13,80±0,43 a	0,9±1,12 a

Medias con letras no comunes difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$

Leyenda: Sales y vitaminas MS, +2,0 mL.L⁻¹ de 2ip + 90 g sacarosa (Control); 1. Sales y vitaminas MS + 2,0 mL.L⁻¹ de 2ip+90 g sacarosa +2,0 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®; 2. Sales y vitaminas MS + 2,0 mL.L⁻¹ de 2ip+90 g sacarosa +2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro®

En el caso de la bulbificación una posible explicación puede ser el efecto de los aminoácidos en la planta tales como la arginina que tiene como función estimular el crecimiento de las raíces, siendo uno de los principales aminoácidos de la rizósfera, además del ácido aspártico, el cual interviene en casi todos los procesos metabólicos de la planta y uno de ellos en el ajo es la bulbificación (Figura 5 y 6).



Figura 5. Bulbificación de plantas *in vitro* de ajo en sistema de inmersión temporal a los 30 días de cultivo (Control).



Figura 6. Bulbificación de plantas *in vitro* de ajo en sistema de inmersión temporal con el uso de del VIUSID Agro® a los 30 días de cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se realizaron estudios donde se determinó utilizar una frecuencia de inmersión de 15 minutos cada 3 horas, para frascos de 5 L, una densidad de 20 brotes, un volumen de 100 mL de medio de cultivo por brote con la adición de 2,5 mL.L⁻¹ VIUSID Agro® y un tiempo de cultivo de 30 días. Con estos parámetros de cultivo se obtuvo la mejor respuesta del material vegetal y el mayor coeficiente de bulbificación (13,80). Esto permitió obtener un mayor número de bulbos con las características morfológicas adecuadas como semillas *in vitro*, que puede ser llevada directamente a la producción.

En los SIT, con la utilización del VIUSID Agro® se observó además la presencia de floración, lo que no ocurre sin la utilización de este estimulante.

Las condiciones de cultivo que se crea en el SIT permiten el mejor crecimiento de los explantes de ajo. Según Berthouly y Etienne (2005), Escalona (2007) y Cabrera *et al.* (2012), los sistemas de cultivo semi-automatizados posibilitan un aporte más eficiente de elementos nutritivos y una renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo.

Numerosos trabajos se han desarrollado para la multiplicación de plantas en SIT. En el cultivo de la malanga, Santos *et al.* (2011) desarrollaron la multiplicación en SIT del clon de malanga *Xanthosoma* 'Viequera' y definieron emplear un tiempo de 14 minutos de inmersión cada seis horas para frascos de 250 mL, una densidad de ocho brotes, un volumen de 15 mL de medio de cultivo por brote y un tiempo de cultivo de 18 días. Con estos parámetros de cultivo obtuvieron la mejor respuesta del material vegetal y el mayor coeficiente de multiplicación (10,40).

CONCLUSIONES

1. Se ajustó el protocolo de desinfección del material vegetal para disminuir las contaminaciones microbianas en el establecimiento *in vitro*.
2. Fue posible el establecimiento y multiplicación *in vitro* del ajo con la adición al medio de cultivo de VIUSID Agro® en concentraciones de 2,0 y 2,5 mL.L⁻¹.
3. Se determinó el efecto positivo del VIUSID Agro® (2,5 mL.L⁻¹) en la bulbificación *in vitro* del ajo con la adición al medio de cultivo de 2,0 y 2,5 mL.L⁻¹ de este producto.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar el VIUSID Agro® en la propagación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.).
2. Escalar los resultados alcanzados para establecer plantaciones en campo y evaluar el comportamiento de los propágulos obtenidos *in vitro* respecto a lo que se utiliza en la producción actual.

BIBLIOGRAFÍAS

- BERTHOULY M. y ETIENNE H. 2005. Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation. pp. 165-195.
- BREWSTER, J.L. 1994. Onions and other vegetables *Allium*. CAB International. Wellesbourne, U.K.

- BURBA, J. 1992. Producción propagación y utilización de ajo. En FAO Producción, poscosecha, procesamiento y aminoácidos de ajo, cebolla y tomate. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- CABRERA, M.; R. KOSKY; E. ESPINOSA y A. ESPINOSA. 2012. Effect of semi-automated culture systems on yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 16(2).
- CALVO, E; R. BARBÓN; E. JIMÉNEZ; M. de FERIA; M. CHÁVEZ, A. CAPOTE y N. PÉREZ. 2007. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 42:298-300.
- ESCALONA, M. 2007. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual.*, 48-50.
- GALVEZ, D.; M. CABRERA, Y. BEOVIDES; A. ROBAINA; S. RODRÍGUEZ y D. RODRÍGUEZ. 2013. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del cultivar de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'. *Biotecnología Vegetal*, 13(2): 107-112.
- GEORGE, E.F. and GJ. KLERK. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. En: E.F. George et al. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*, pp. 65-113.
- JACKSON, MB. 2005. Aeration stress in plant tissue cultures. En: Hvoslef-Eide A.K. and W. Preil. (Ed) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 459-473. ISBN 978-1-4020-3199-1.
- KELLER J. y FRITSCH R. 1997. Establishment of *in vitro* clones in the Gatersleben garlic collection. *Actas Etnobotánica*. 92: 155-161
- LÓPEZ GUADARRAMA, A. 2010. Principales funciones de los aminoácidos en las plantas. <http://www.agrofischer.com.mx/2010/12/10/funciones-de-los-aminoacidos-en-vegetales/>. Consultado 12 de octubre de 2015.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- RAMOS de S., G. 1991. El cultivo del ajo en el Estado Mérida. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Serie de paquetes tecnológicos. Maracay.
- SANTOS, A.; M. CABRERA; M. BASAIL; J. LÓPEZ; A. RAYAS y V. MEDERO. 2011. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de Malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13 (2): 97-106.
- SIMPSON, G. 2006. Plant Systematics. En: *Diversity and classification of flowering plants*. pp.137-226. Elsevier Academic press.
- VILCHEZ, J.; N. ALBANY; L. MARTÍNEZ; M. MOLINA; C. ÁLVAREZ; E. LEAL y L. BERMÚDEZ. 2011. Establecimiento *in vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Rev. Fac. Agron.*, 28(1):434-444.