

1.INTRODUCCION

El ajo (*Allium sativum L.*) es una planta de importancia económica y medicinal, ampliamente cultivada en muchas regiones del mundo. La micropropagación de ajo, a través de técnicas de cultivo in vitro, se ha convertido en una herramienta esencial para la producción de plantas libres de enfermedades y de alta calidad. Esta técnica permite la producción masiva de plantas a partir de una pequeña cantidad de material vegetal, lo que es especialmente útil en el caso de cultivos que presentan dificultades para propagarse por métodos convencionales. (Pérez et al., 2010).

El ajo (*Allium sativum L.*) es un cultivo de importancia económica para el departamento de Tarija y especialmente en los municipios del puente la zona al alta de Iscayachi ya que se produce el 60 a 80% de la producción de la región utilizada para el consumo local como de países vecinos. (Arebalo M, 2014)

Sin embargo, existen factores que afectan el desarrollo del cultivo de Ajo (*Allium sativum L.*), por lo que la producción presenta una falta de uniformidad en los diámetros de los bulbos, motivo por el cual el producto que se obtiene de la región no puede ser competitivo tanto en el mercado nacional como en el de exportación. Dentro de estos factores se encuentra la fertilización que es uno de los más importantes dentro del proceso productivo del Ajo, ya que de esta actividad dependen los incrementos o decrementos en el rendimiento y por ende al rendimiento del cultivo. (Arebalo M, 2014)

Las variedades que se cultivan en la zona son, la variedad mendocino rosado, criollo, ajo blanco. (2017) 2 En el departamento de Tarija la principal producción está dada en la Provincia Méndez, municipio de El Puente y una mínima proporción en la Provincia Avilés, municipio de Yunchará. (Arebalo M, 2014)

2. Antecedentes

El ajo, procede del centro y sur de Asia desde donde se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo, se cultiva desde hace miles de años. Unos 3.000 años a. C., ya se consumía en la India y en Egipto. A finales del siglo XV los españoles introdujeron el ajo en el continente americano. (informe estadístico de ajo, 2020)

De acuerdo a la FAO, la producción mundial de ajo para el año 2018 sobrepasó los 28 millones de toneladas, observándose en la última década un importante incremento en los rendimientos del cultivo al pasar de 16.7 toneladas por hectárea en 2009 a 18.41 t/ha en 2018. Se destaca que la producción de ajo está dominada por la producción China, que provee el 78% de la producción mundial de ajo, así en 2018 obtuvo un volumen de producción de 22.3 millones de toneladas.

China, además de ser de lejos el mayor productor mundial de ajo, registra el mejor rendimiento que alcanza a 28.3 toneladas por hectárea, superando a Uzbekistán que alcanza las 26.6 tn/ha. Por su parte la India pese a ser el segundo país productor de ajo que alcanzó a 1.7 millones de toneladas en 2018, muestra el más bajo rendimiento. (informe estadístico de ajo, 2020)

El cultivo de ajo en Bolivia se encuentra alrededor de 2.7 mil toneladas en la última campaña agrícola 2018-2019, tras lograr su mayor volumen de producción en la campaña agrícola 2015- 2016 que fue de 3.731 toneladas. (informe estadístico de ajo, 2020)

Potosí 40% Cochabamba 22% Tarija 19% Chuquisaca 12% Oruro 7% Santa Cruz 0%
Distribución Potosí Cochabamba Tarija Chuquisaca Oruro Santa Cruz. (informe estadístico de ajo, 2020)

En el departamento de Tarija, se estima consolidada una superficie de producción de 150 hectáreas, con un rendimiento promedio de 5 toneladas por hectárea (110 qq/ Ha.) lográndose una producción bruta por año de 750 toneladas. (final, 2003)

En la producción de ajo están involucradas entre 500 y 750 familias. En esta zona se encuentra bien establecida al menos una asociación de productores, APAIS, en Iscayachi y aun que diversificada en otros rubros la asociación APASO, en el Puente, para la zona del Río San Juan del Oro. (final, 2003)

3. Descripción del problema.

La causa por los cuales la producción del ajo en Bolivia es baja debido al uso de semilla de baja calidad, libre de plagas y enfermedades no se cuenta con semillas de alta calidad como semilla básica, prebásica registrada y certificada, que garanticen una buena producción y

sobre todo contar con semilla de calidad, lo cual obliga al productor a utilizar semilla de baja calidad que no es recomendable para ellos.

El ajo es un cultivo de gran importancia tanto a nivel nutricional y medicinal. Sin embargo, la producción de ajo enfrenta varios desafíos, entre los que destacan las enfermedades y la baja calidad de semillas. La producción actual de ajo mediante métodos tradicionales no satisface la necesidad o demanda que requiere el productor y el consumidor.

La necesidad de optimizar el cultivo del ajo para poder controlar la enfermedad que lo afecta a la producción de ajo y así mismo poder producir semilla básica, prebásica para mejora la producción departamental y a nivel nacional, el cultivo in vitro ofrece buenas técnicas para poder multiplicar el ajo de manera rápida y libre de enfermedades.

3.1. Planteamiento del problema.

El uso de semillas no certificadas, inducen la presencia de patógenos y virus en los bulbos de ajo, que afectan la productividad y la calidad del cultivo, disminuyendo la rentabilidad para los agricultores.

4. Justificación.

La micropropagación ofrece una solución efectiva para producir plantas de ajo libres de enfermedades y de alta calidad genética. Esta técnica permite la multiplicación rápida y masiva de plantas a partir de explantes pequeños, asegurando uniformidad y sanidad.

La producción de semilla de alta calidad con la técnica de cultivo in vitro va permitir el mejoramiento de la producción en el cultivo de ajo, también permitirá obtener plantas libres de patógenos como ser hongos, virus y bacterias que suelen afectar negativamente la calidad y el rendimiento del ajo cultivado de manera convencional.

El cultivo in vitro permite multiplicar rápidamente el material vegetal a partir de un pequeño explante, esto es especialmente útil para para variedades de ajo de alto valor o que son difícil de propagar por método tradicional.

5. Objetivos

5.1. Objetivos Generales

- ❖ Evaluar la efectividad de tres medios de cultivo en el establecimiento y multiplicación de ajo (*Allium sativum* L.) durante las fases iniciales del cultivo *in vitro* en el laboratorio de fitopatología y cultivo *in vitro* de la F.C.A.F. – U.A.J.M.S. con el fin de identificar el medio que optimice el crecimiento y desarrollo de las plántulas y maximice la producción de microbulbos.

5.2. Objetivo Específicos.

- ❖ Determinar el porcentaje de sobrevivencia y establecimiento de explantes de ajo en los tres medios de cultivo en el laboratorio.
- ❖ Evaluar el crecimiento y desarrollo de los explantes de ajo (*Allium sativum* L.), en cada uno de los medios de cultivo durante las fases de establecimiento y multiplicación.
- ❖ Determinar el medio de cultivo más adecuado para el establecimiento y multiplicación eficiente de ajo *in vitro* en el laboratorio.

6. Hipótesis.

Ha₁: Al menos uno de los medios de cultivo de establecimiento y multiplicación proporcionará mejores resultados en términos de sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de los explantes de ajo.

Ha: no existe diferencia en los medios de cultivo en la fase de establecimiento y multiplicación.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Origen y distribución geográfica

Se reportan inicios de la historia del ajo en Asia Central, y su cultivo en los países mediterráneos. Los Griegos, Romanos, Hindúes y Chinos ya gustaban del ajo, mientras los Egipcios (3,000 años a.c.) lo consideraban especie sagrada. (Heredia y Delgadillo, 2000).

El ajo fue introducido a América Latina a fines del siglo XIV, en el segundo viaje de Colón al Nuevo Mundo, y con las subsecuentes reintroducciones procedentes de España, las Islas Canarias e Italia (Jaramillo, 1994).

El cultivo del ajo (*Allium sativum* L.), es considerado hoy día como una de las hortalizas más rentable a nivel nacional. Su uso es generalmente para condimento aun cuando muchos estudios han demostrado una serie de propiedades para la salud humana.

Es una de las hortalizas más antiguas usadas por el hombre, se cree que se originario de Asia central, desde donde se extendió al sur de Europa siendo introducido a América por los españoles durante la época de la colonia. (INFOAGRO 2002)

El ajo (*Allium sativum* L.), es procedente del centro y sur de Asia, desde donde se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo, se cultiva aproximadamente desde hace unos 3.000 años a. C; en donde ya se consumía en la India y en Egipto. A finales del siglo XV los españoles lo introdujeron al continente americano. (Ramos, 1991).

Su uso continuó durante el Imperio Bizantino y la Edad Media, en la que se seguía utilizando para tratar úlceras, dolores y neutralizar venenos. De hecho, en el siglo VII la Escuela de Salerno lo incluyó como medicamento respetado.

En Bolivia el ajo fue introducido por los españoles en la época de la colonia y se cultiva como planta hortícola asociado a la cebolla y otros cultivos (Terán, 1997).

1.2. Importancia económica

A nivel mundial el ajo ocupa el 2º lugar dentro de las especies del género *Allium* después de la cebolla (*Allium cepa* L.) (FAOSTAT, 2012). Reportándose una producción anual de 11.79 millones de toneladas de ajo. China es el país líder en producir ajo alcanzando un 74 % con una producción total de 19,984,724 t, el segundo lugar India con 1,252,000 t, seguido por

corea con 353,761 t, y posteriormente Egipto, Rusia, Ucrania, España y Estados Unidos (FAOSTAT, 2014).

México en el 2016 alcanzó una producción de 75,266 toneladas (SIAP, 2016). Los principales estados productores de ajo son Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California, Aguascalientes y Sonora, (Ochoa et al., 2012; Calderón, 2013). Aportando el 87.1 % de la producción nacional (SAGARPA, 2007).

El ajo producido en Bolivia se considera de excelente calidad por su fuerte aroma y sabor teniendo buena aceptación en los mercados internacionales. Los rendimientos son variables según la técnica del cultivo, las variedades de las que se trate y la forma de medirlos.

En el departamento de Tarija, se estima consolidada una superficie de producción de 150 hectáreas, con un rendimiento promedio de 5 toneladas por hectárea (110 qq/ Ha.) lográndose una producción bruta por año de 750 toneladas.

1.3. Beneficios del ajo

No es la primera vez que hablamos de los numerosos beneficios del ajo y de sus distintas variedades como es el ajo negro. No es de extrañar que se haya utilizado con fines medicinales desde tiempos remotos ya que hoy en día podemos comprobar que contiene más de 2.000 componentes activos que le otorgan infinidad de propiedades medicinales como:

- Propiedades antibacterianas.
- Mejora la circulación.
- Reduce el colesterol.
- Es antioxidante.
- Estimula la respuesta inmunitaria.
- Es diurético, entre muchas otras cualidades.

En definitiva, el ajo, pese a sus idas y venidas en el pasado, se ha establecido hoy en día como referente de la gastronomía mediterránea y como un superalimento con grandes beneficios para la salud. Es por ello que su cultivo ha aumentado considerablemente en España y esto ha dado pie a la necesidad de acondicionar espacios para su conservación a lo largo del año. (BERNARD, 2023)

1.4. Producción de ajo.

1.4.1. Producción mundial.

La mayor proporción de la superficie dedicada al cultivo del ajo se concentra en los países asiáticos, principalmente China, que en el año 2010 alcanzó el 55% de la superficie cosechada y un 77% de la producción. Chile, por su parte, representa sólo un 0,1%, tanto de la superficie cosechada como de la producción mundial de ajo.

En el año 2010 el 74% de la superficie cosechada y el 86% de la producción mundial de ajo corresponden a cinco países: China, India, Corea del Sur, Egipto y Rusia. Debido a la magnitud de la producción en China, un análisis profundo de la situación mundial debe estar centrado en ella.

China, además de ser de lejos el mayor productor mundial de ajo, registra el mejor rendimiento que alcanza a 28.3 toneladas por hectárea, superando a Uzbekistán que alcanza las 26.6 tn/ha. Por su parte la India pese a ser el segundo país productor de ajo que alcanzó a 1.7 millones de toneladas en 2018, muestra el más bajo rendimiento entre los 10 principales países productores a nivel mundial, siendo este de apenas 5.7 toneladas por hectárea en 2018 (U.A.J.M.S, 2018)

1.4.2. Producción nacional

Según estimaciones conjuntas entre el Instituto Nacional de Estadística y el Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras, el departamento de Potosí es el mayor productor de ajo a nivel nacional al haber alcanzado un volumen de producción de 877 toneladas durante la campaña agrícola 2018 – 2019, seguido del departamento de Cochabamba que logró obtener una producción de 495 toneladas de ajo en esta última campaña agrícola.

El departamento de Chuquisaca es el departamento productor de ajo que reporta la mayor tasa de rendimiento de 5.13 toneladas por hectárea, a partir de la cual obtuvo 261 toneladas de ajo en dicha campaña agrícola. (U.A.J.M.S, 2018)

1.4.3. Producción departamental

El departamento de Tarija registró una producción de 413 toneladas de ajo, en la provincia Méndez y en la provincia Avilés que son las zonas más productoras.

1.5. Descripción Botánica

(Acosta, 2018), indica que, el ajo es una planta perteneciente a la familia de las Liliáceas, y su nombre botánico es “*Allium sativum* L.” que es una, vivaz y rústica.

El ajo (*Allium sativum*) pertenece a la familia de las liliáceas, es una planta bianual, pero es plantada como una planta anual. Tiene las raíces fasciculadas el bulbo formado por unidades elementales o dientes (8-14) y el bulbo está recubierto por una capa envolvente.

El diente está formado por 2 hojas y una yema vegetativa. Las hojas son planas y acanaladas. El tallo poco desarrollado (disco) en la base del bulbo. En el segundo año se forma la inflorescencia en forma de umbela. El ajo se planta como dientes y brota como una yema.

Taxonomía

Reino: Vegetal.

Phylum: Teleomophytae.

División: Tracheophytae.

Sub división: Anthophyta.

Clase: Angiospermae.

Sub clase: Monocotyledoneae.

Orden: Liliflorales.

Familia: Liliaceae.

Nombre científico: *Allium sativum* L.

Nombre común: Ajo.

Fuente: (Herbario Universitario, 2024)

1.6. Morfología de la planta.

1.6.1. Hoja

Las hojas están unidas al tallo y se caracterizan por ser delgadas distribuyéndose de forma alterna. Miden de uno a tres cm de ancho y de largo alcanzan los 20 a 50 cm. Las hojas se integran de una vaina y un limbo el cual tiene las características de ser 7 planas, acanaladas, largas, estrechas, con una nervadura central y terminando en punta. La vaina se distingue por tener una forma cilíndrica y formar el falso tallo o pseudotallo corto y erecto. En ellas no se acumulan sustancias nutritivas, forman las túnicas, con una coloración diversa y su función es proteger a los bulbillos (U.A.J.M.S, 2018)

1.6.2. Tallo

El tallo se distingue por ser blando, liso y está constituido por las vainas de las hojas. Su parte basal es denominado disco y se integra por una masa cónica, tunicada que alcanzando la madurez se vuelve dura. En esta parte del tallo se encuentran los bulbillos. El tallo llega a medir 30 mm de diámetro y 5 mm de altura denominado se tallo verdadero y se encuentra subterráneo a partir de este crecen las hojas y nace la raíz. (U.A.J.M.S, 2018)

1.6.3. Raíz

Presenta raíz fasciculada, su coloración es blanca y con ramificaciones limitadas. El enraizamiento se considera superficial estando por encima de los 40 cm de profundidad y en algunos casos llega a los 70 y 80 cm de longitud.

1.6.4. Bulbo

El bulbo se integra por el conjunto del disco, bulbillos y túnicas externas que lo envuelven caracterizándose por ser transparentes, membranosas que adquieren una tonalidad del blanco a rojizo o coloración púrpura. El bulbo es el lugar donde se acumula las sustancias nutritivas (García, 1998). La bulberización es el proceso que inicia cuando las yemas axilares de las hojas se hipertrofian formando los bulbillos comúnmente denominados dientes de ajo y estos 8 están rodeados de túnicas internas denominadas catáfilas. El tamaño, número y la forma de los bulbillos dependerá del cultivar que pertenece. Para que inicie la etapa de bulberización

es necesario que el cultivo tenga cierto número de horas frío y tenga fotoperíodos largos con temperaturas que oscilen entre 18 y 20 °C. (U.A.J.M.S, 2018)

1.6.5. Bulbillos o Dientes

Los bulbillos se integran por hojas de protección las cuales carecen de lámina foliar. Cada uno de los dientes tiene una cubierta protectora cilíndrica esta hoja es de almacenamiento y posee una pequeña yema. Las hojas de reserva o de almacenamiento integran más del 85 % del peso del bulbo. Las reservas las emplea para la brotación de un nuevo ejemplar. Cada bulbillo es considerado un bulbo en potencia al carecer de semilla botánica es la forma tradicional de propagarse.

1.6.7. Escapo Floral

El escapo floral está dispuesto en umbela y se genera a partir de la yema terminal del disco basal, se integra por seis pétalos, seis estambres, ovario coronado, estilo filiforme y estigma. La coloración es rosada o verde, tiene un pedicelo largo y la umbela alcanza entre los 7 y 10 cm de largo. *Allium sativum* se caracteriza por no producir semilla y esto se debe a que algunas variedades la secuencia del desarrollo durante o después de la meiosis es interrumpida y como consecuencia sus flores abortan. (U.A.J.M.S, 2018)

1.7. Variedades

1.7.1. Criollo

El ajo criollo es una variedad muy conocida en la cultura agrícola costarricense y se destaca por su tamaño compacto. Aunque sea una variedad más pequeña de lo que el mercado está acostumbrado a consumir, los que conocen este cultivo saben la cantidad de aceite e intensidad de aroma que posee a la hora de cocinar. (plantae, 2024)

1.7.2. Rosado

El ajo rosado es una variedad mejorada en Chile. El bulbo tiene las catáfilas externas de color blancas y presenta el promedio de 15 dientes de color rosado pálido. Sus hojas son erectas y de color verde oscuro. Esta variedad fue seleccionada por su alto rendimiento y calidad. Calidad está dada por la ausencia total de ramaleo, su forma regular y buena capacidad de guarda. (Gonzales, 2006)

1.7.3. Morado INTA

Típicas variedades para ristra temprana, de bulbos muy grandes color blanco variegado con estrías gruesas de color morado y pocos dientes color castaño claro. Poseen muy poca conservación. Son ajos para consumo en verde y aderezo de ensaladas. Las principales variedades son MORADO INTA y SERRANO.

1.7.4. Coral INTA

Esta variedad, denominada “Coral INTA”, podría ser cultivada en los valles precordilleranos de Cuyo y en los ambientes serranos del centro y noreste argentino. “Se trata de una planta medianamente vigorosa que produce bulbos de medianos a grandes”, especificó, al tiempo que señaló que la fecha estimada de cosecha ronda el 18 de noviembre.

Respecto de las ventajas, aseguró que este cultivar, cuya producción está dirigida –sobre todo– al consumo directo, “permite anticipar el ingreso en el mercado entre 30 y 40 días en comparación con los cultivares de ajo colorado tardíos”. Además, debido a la fecha temprana de cosecha, facilita racionalizar el uso de las cosechadoras mecánicas. (Nueva variedad de ajocolorado temprano, 2024)

1.7.5. Rubí INTA

Tipo Comercial: Colorado. Obtención: 2005 EEA La Consulta INTA Origen: población de origen “Colorado Mendoza”. INASE. Grupo Fisiológico: IV a (altos requerimientos de frío y fotoperiodo largo para bulbificar ambiente templado a templado frío, entrega tardía). Inicio de bulbificación a mediados de octubre con 10 hojas verdes y 500 cm² de área foliar para dientes semilla de 6 g. Gran adaptación y estabilidad a ambientes ricos y pobres. Planta se caracterizan por llegar a cosecha con más de 8 hojas de láminas muy largas y, con porte erecto, con vara floral emergente (hardneck), en época semi tardía (fines de noviembre). Bulbo: de color blanco, pesan en promedio 72 gramos (entre 62 g y 91 g), con un diámetro ecuatorial de 61 mm (entre 53 mm y 68 mm). Dientes: presentan 13 dientes grandes de color rojo violáceo intermedio distribuidos en 2 hojas fértiles con 6 dientes en la primera y 7 en la segunda. Ciclo: 235/240 días (entre mediados de abril y principio de diciembre). Rendimiento: alto (18.700 a 27.300 kg/ha de ajos secos, cortados y limpios), con más del 70 % de calibres superiores a 55 mm en densidades de 300.000 plantas/ha, en líneas simples.

Conservación frigorífica: excelente hasta agosto/setiembre conservados a temperatura ambiente y combinado antibrotante con frío puede extenderse hasta un año de muy buena conservación. Características sanitarias: Medianamente sensible a ataques de *Penicillium* sp. Características industriales: altos sólidos solubles (> 35 %). (Andreani, 2015)

1.7.6. Chino morado

Ajo chino de túnica morada violácea, de tamaño de regular a grande, forma una cabeza dividida en gajos que comúnmente son llamados dientes, el número de dientes varia de 10 a 12 son carnosos y curvada arqueada en uno de sus extremos, de piel blanca al retirar las túnicas que cubre el diente, el bulbo es de forma esférica achatada por los costados Cada uno de los dientes puede dar origen a una nueva planta de ajo, ya que poseen en su base una yema terminal que es capaz de germinar incluso sin necesidad de plantarse previamente. (Miguel, 2023)

1.7.7 Chino blanco.

El ajo chino prefiere desarrollarse a pleno sol y también tolera sombra, requiere un suelo con buen drenaje y abundante materia orgánica para mejora la retención de humedad del suelo.

1.8. Características del cultivo.

El ajo o *Allium sativum* es una planta bulbosa, vivaz y rústica que pertenece a la familia de las *Liliaceae*, *subfam. Allioideae*. Su raíz se compone de 6-12 bulbillos, conocidos tradicionalmente como dientes de ajo, unidos por la base formando un cuerpo con forma redondeada llamada 'cabeza de ajos'. Cada uno de los 'dientes', así como el bulbo, queda recubierto por una membrana semitransparente. De su parte superior nacen partes fibrosas que enraízan la planta a la tierra y le proporcionan el alimento. Su color es blanco-amarillento una vez retirada la delgada capa que lo recubre. Esta película posee tonos que van desde el blanco al gris. Si algo caracteriza al ajo son sus intensos aroma y sabor. (comunidad autonoma de la region de murcia, 2024)

1.9. Adaptación climática del ajo.

La temperatura umbral mínima para crecimiento está entre 4 y 8°C, mientras que la temperatura crítica de helada es de 1°C. En etapas tempranas de desarrollo le son favorables

temperaturas de entre 8 y 16°C para la brotación y la formación de bulbos. Después de la inducción de bulbos, temperaturas de entre 18 y 20°C son favorables para el crecimiento del bulbo; la temperatura máxima durante este periodo no debe ser superior a los 30°C. (Corral, 2020)

Para el logro de buenos rendimientos, la media óptima está alrededor de los 18°C, con una máxima que no debe superar los 26°C. Para una buena germinación, los “dientes” que se utilizan como material de propagación debe - rían mantenerse, el mes antes de la siembra, a temperaturas de 0-10°C. (Corral, 2020)

El punto de congelación es de 5°C, alcanzándose el crecimiento cero a 5°C; la mínima, óptima y máxima para desarrollo son 6, 10-20 y 35°C. Para brotación las temperaturas mínima, óptima y máxima son 6, 20-22 y 30°C.

Las bajas temperaturas promueven la iniciación floral, mientras que altas temperaturas la inhiben y promueven el desarrollo del bulbo. Para diversas combinaciones de fotoperíodo y temperatura, existen diferentes respuestas en cuanto a floración y formación de bulbos. (Corral, 2020)

1.10. Cultivos in vitro en Bolivia

En Bolivia existe cerca de 18 laboratorios inscritos en REDBIO1, (**Red Latinoamericana de Biotecnología**). aunque el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales no pasa de los 25 años. Su aplicación práctica en el campo agrícola es la conservación de recursos fitogenéticos y la generación de plantas de alta calidad genética y sanitaria, factibles de ser certificadas. Estas técnicas son aplicadas a la conservación de tubérculos, raíces, frutales y últimamente, especies forestales. Los laboratorios bolivianos se aglutinan en torno a la REDBIO Bolivia, misma que permite formar parte de los 750 laboratorios de biotecnología vegetal registrados en toda Latinoamérica y el Caribe (Ávila e Izquierdo, 2006).

Actualmente, las técnicas de cultivo de tejidos más utilizadas en Bolivia son las siguientes:

- La limpieza viral para la obtención de plantas libres de patógenos.

- La micropropagación a gran escala de plantas, que genera semilla certificada de alta categoría en el caso de papa y de material vegetal con alta calidad genética y fitosanitaria en especies aún no incluidas en el proceso formal de producción certificada.
- La conservación in vitro como componente de la estrategia de conservación de los bancos de germoplasma de especies multiplicadas vegetativamente o de semilla recalcitrante. Estas técnicas, impulsadas por los centros de investigación y universidades, han beneficiado a empresas, productores, comunidades campesinas y agricultores al poder ofertar materiales de alta calidad sanitaria. Esta aplicación ha fortalecido a entidades vigentes anteriormente como el Programa Nacional de Semillas y el Sistema Nacional para la Conservación de Recursos Genéticos para la Agricultura y la Alimentación (SINARGEAA). La aplicación del cultivo de tejidos en Bolivia (VMARNDF, 1999) inicia en 1986 con la Unidad de Producción de Semilla de Papa (SEPA), que basa su estrategia para la producción de cerca de 3.000 toneladas anuales de semilla de papa, a partir de plántulas libres 7 UMSS - CIUF 1 Red Latinoamericana de Biotecnología. www.redbio.org de enfermedades mediante el cultivo de tejidos in vitro. Los mecanismos de control interno de calidad, entre ellos el test de ELISA para detectar la eventual presencia de virus, están sujetos a un cronograma tanto para las plántulas de laboratorio como de invernadero.

1.10.1. Micropropagación

Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades-La micropropagación se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por ingeniería genética, mutagénesis o mejora genética. Se utiliza también la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente.

La micropropagación de plantas In Vitro es una técnica que consiste en propagar plantas de forma asexual. Con este método replicamos plantas a partir de un explante, a partir de hojas, tallos, raíces, semillas o cualquier otro órgano, para cultivarlo en un laboratorio.

De esta forma podemos crear un ambiente artificial y controlarlo, por ejemplo, la temperatura, la humedad, nutrientes esenciales, entre otros que nos permiten asegurar un crecimiento exitoso.

El resultado de este proceso son plantas idénticas a la planta madre de la que se tomó el explante. Sus frutos y demás características tendrán el mismo sabor, tamaño, color, resistencia a enfermedades, al medio ambiente, entre otros.

Esta técnica se utiliza para multiplicar plantas mejoradas genéticamente, especímenes únicos que cuentan con características ideales o para acelerar el mejoramiento u obtener abundante material para investigaciones.

Etapas de la micropropagación. (BIOPLAN IN VITRO. s f, s.f.)

1.10.2. Dentro del proceso de micropropagación diferenciamos varias fases o etapas:

- 0: Selección y Preparación de la planta madre.
- 1: introducción del material seleccionado in vitro.
- 2: Multiplicación de brotes.
- 3: Enraizamiento.
- 4: Aclimatación.

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas in vitro; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación in vitro.

fase 0: preparación de la planta madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

fase 1: introducción del material in vitro

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo in vitro. (Alicia Castillo, 2004)

fase 2: multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

fase 3: elección de un medio de enraizamiento de los explantes

Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 centímetros. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto, el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea. (Alicia Castillo, 2004)

fase 4: aclimatación de los explantes enraizados

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso depende de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados

de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. La siguiente lista presenta una comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (in vitro) respecto a una planta en condiciones naturales (in vivo): (Alicia Castillo, 2004)

1.10.3. In vitro

- No realiza fotosíntesis.
- Crecimiento en condiciones controladas.
- Crecimiento en condiciones de asepsia.
- Alta humedad relativa.
- Estomas no funcionales.
- Ausencia de pelos radiculares.
- Ausencia de cera en la cutícula. (Alicia Castillo, 2004)

1.10.4. In vivo

- Realiza fotosíntesis.
- Crecimiento en condiciones no controladas.
- Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente.
- Humedad relativa variable.
- Estomas funcionales.
- Presencia de pelos radiculares.

- Presencia de cera en la cutícula Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando. (Alicia Castillo, 2004)

1.10.5. Dos características fundamentales a tener en cuenta

1.10.5.1.- La asepsia (ausencia de gérmenes).

1.10.5.2.- Factores que afectan el crecimiento.

Ambiente químico:

- Composición del medio de cultivo.
- PH.

Ambiente físico:

- Temperatura.
- Luz y fotoperíodo.
- humedad. (Giambiasi, 2007)

1.10.6. Establecimiento in vitro.

El cultivo in vitro consiste en tomar una porción de una planta (ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas. Durante las últimas décadas, la técnica del cultivo “in vitro” ha ganado especial interés para el establecimiento de diversas plantas para la producción de compuestos o la obtención de cultivos más sanos y con características genéticas específicas. El cultivo in vitro de vegetales se basa en el aislamiento de órganos, tejidos o células

vegetales y en el ajuste de las condiciones necesarias para la obtención de respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de estos explantes.

El cultivo de células y tejidos *in vitro* (CCTV) involucra diferentes técnicas a partir de diferente material vegetal tales como cloroplastos, células, tejidos, órganos e incluso plantas completas. La totipotencia es la capacidad de una célula de generar un individuo completamente idéntico a la célula madre, la cual tiene la misma información genética y la misma función (Kieran & Col, 1997), es decir, indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa. (Rivas, 2016)

1.10.6.1. Ventajas de la técnica de CCTV

- Producción de gran número de plantas.
- Obtención de plantas en cualquier época del año.
- Almacenamiento de plantas en poco espacio.
- Producción de plantas libres de contaminación, enfermedades y plagas.
- Herramienta para el fitomejoramiento: plantas mejoradas.
- Propagación de especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Clonación de individuos "élite", son desempeño agronómico destacado.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma: material de un conjunto de individuos que representa la variabilidad genética de una población vegetal.
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas.
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides y dobles haploides.
- Estudios fisiológicos diversos. (Rivas, 2016)

1.10.6.2. Desventajas de la técnica in vitro

- No todas las especies son viables de propagar in vitro; algunas son recalcitrantes.
- Cada especie requiere de métodos específicos.
- La estandarización de protocolos resulta costosa. (Rivas, 2016)

1.10.7. Sustancias de crecimiento. (hormonas)

Las plantas dentro de su desarrollo requieren de reguladores hormonales, capaces de controlar toda la actividad metabólica en función de garantizar la homeostasis intracelular y extracelular. Cada fitohormona de acuerdo con su estructura química realiza diferentes interacciones para poder cumplir con sus funciones. Las principales fitohormonas utilizadas en el crecimiento vegetal son las auxinas, giberelinas, citoquininas, entre otras.

1.10.7.1 Auxinas

Son un tipo de fitohormonas especializadas en diferentes procesos a nivel vegetal. Los principales puntos de acción se encuentran a nivel celular, donde tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular (4). Esta suele encontrarse muy bien distribuida en la mayoría de las células y tejidos vegetales, por lo que puede interferir en procesos de diferenciación unicelular, pluricelular o incluso tener acción en los diferentes tejidos vegetales. Dadas las funciones que posee esta hormona es considerada como un tipo de morfógeno capaz de inducir la diferenciación celular de órganos como raíces, tallos y hojas, y así mismo, dar origen a ellos (5,6). (Cortes1, 2019)

1.10.7.3 Giberelinas

Las giberelinas, también conocidas como ácidos giberélicos, tuvieron su primera aparición en años cercanos a la década de 1930, cuando algunos científicos analizaron por primera vez algunas fitopatologías relacionadas con el arroz. Dentro de esta investigación se pudo observar la asociación de un hongo que anteriormente era conocido como *Gibberella fujikuroi* como agente etiológico de la enfermedad “bakanae” en co (AIA) que es la principal auxina producida de manera natural, aunque también se conocen otro tipo de auxinas que son producidas de manera sintética como el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalenacético (NAA). (Cortes1, 2019)

1.10.7.2. Citoquininas

Las citoquininas son un tipo de fitohormonas específicas derivadas de la adenina que tuvieron su primera aparición entre los años de 1940 y 1950, cuando Caplin y Steward, (1948) empezaron a estudiar el efecto que podía tener el extracto de levadura y el jugo de tomate sobre el crecimiento vegetal. Durante este estudio se pudo observar que estas sustancias tenían la capacidad de iniciar y sustentar la proliferación de tejidos madre cuando eran aplicadas sobre organismos vegetales en pequeñas cantidades (15). Con el paso del tiempo fueron estudiándose otros tipos de sustancias que podían tener un efecto similar, encontrando en el agua de coco una de las primeras citoquininas que fue aislada y reconocida por primera vez como la zeatina (proveniente del endospermo inmaduro del maíz.) (16,17)

Las citoquininas tienen la capacidad de estimular e inducir una alta proliferación y división celular, suelen inducir la iniciación y elongación de las raíces al igual que pueden activar la senescencia de las hojas, permitiendo estimular el desarrollo fotomorfogé- 118 NOVA. 2019; 17 (32): 109-129 nico vegetal y jugar un rol importante en el aumento y generación de la producción de brotes a nivel vegetal. (Cortes1, 2019)

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de fitopatología y cultivo *in vitro* perteneciente a la F.C.A y F que se encuentra ubicado en la zona del tejero municipio de cercado en el departamento de Tarija.

2.2. Ubicación

ubicado geográficamente entre los paralelos 21° y 15' de latitud sur, y los meridianos 64°21'' y 65°05' de latitud oeste con una altura promedio de 1850 m.s.n.m, específicamente en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales de la Universidad Autónoma "Juan Misael Saracho" (Maldonado, 2018).

21°32'31"S 64°43'19"W

FIGURA N° 1 Ubicación del Laboratorio de Fitopatología y Cultivo *in vitro*.



Fuente: (Earth google, 2024)

2.3. Material vegetal

Se utilizó dientes o bulbillos de ajo *Allium sativum* L. obtenidas de la comunidad de Rosario municipio de Yunchará.

Variedad rosada.

2.3.1. Áreas del laboratorio

El laboratorio de fitopatología y cultivo *in vitro* es un espacio especializado al estudio de enfermedades de las plantas y a la propagación de material vegetal bajo condiciones controladas, su objetivo principal es identificar, diagnosticar y controlar los agentes patógenos que afectan a los cultivos agrícolas,

Cuenta con los siguientes equipos de trabajo, dos microscopios dos lupas cajas Petri agujas histológicas cubre objetos porta objetos para poder identificar las enfermedades de las muestras que llegan al laboratorio.

El laboratorio cuenta con tres salas.

1.-Una sala de preparación de medio y esterilización. - La sala cuenta con todos los materiales necesarios que se requiere también cuenta con macro, micro nutrientes y vitaminas necesarias para la preparación de medio.

También cuenta con una autoclave para esterilizar los medios de cultivo a 120° y un horno de desinfección de materiales a 180° que se usara en la cámara de flujo para poderlos dar utilidad, también cuenta con una balanza digital para poder pesar las vitaminas que se requieren pesar.

También cuenta con un medidor de ph para la preparación de medios y un carrito o bandejas para el transporte de los medios a la cámara.

2.- Una sala de siembra. –Es un área estéril destinada a la manipulación de los explantes y su siembra en los medios preparados. Cuenta con dos cámaras de flujo laminar que proporciona un ambiente libre de contaminación, luz UV para desinfección y condiciones estéticas de limpieza. El personal debe ingresar con ropa estéril y seguir los protocolos para evitar la contaminación.

3.-Una sala de crecimiento de los explantes. - Esta sala está diseñada para proporcionar las condiciones óptimas de temperatura, humedad, e iluminación necesaria para el desarrollo de los cultivos. Dispone con estantería con luz artificial controlada, sistema de climatización y monitoreo del ambiente. Aquí los cultivos permanecen durante varias semanas hasta alcanzar la fase deseada para su trasplante o subcultivo.

2.3.2. Materiales

Se utilizaron diferentes materiales para la elaboración de esta investigación.

Área de preparación

- Frascos de vidrio.
- Tubos de ensayo.
- Balanza de precisión.
- Pipetas.
- Matraces.
- Erlenmeyer.
- Probetas.
- Agitador.
- Canastillas.
- Ph metro.
- Agua destilada.
- Marcador.

Área de esterilización

- Autoclave.
- Horno de esterilización.

Área de siembra

- Cámara de flujo laminar.
- Mechero.
- Pinzas.
- Aguja.
- Bisturí.
- Alcohol 90%.

Área de crecimiento

- Luz floreciente.

- Control de temperatura.
- Estantes.
- Plastafor.

Medio de cultivo

Componentes

- Macro M1X 10.
- Macro M2X100.
- Macro M3X100.
- Vitaminas M4X 100.
- Thianime 10mg/100ml.
- Sulfato de adenina 500mg/200ml.
- Mioinositol 100 mg /200ml.
- Azúcar.
- Agar 10ml/l.
- AIA 10mg/500ml.
- KIN 10mg/500ml.
- BAP 10mg/500ml.
- ANA 10mg/100ml.

Material escritorio

- Cuaderno.
- Lápiz.
- Borrador.
- Computadora.
- Impresora.

2.4. Metodología.

El método de investigación utilizado en el trabajo de investigación es el método.

Inductivo – Deductivo.

La adopción del método inductivo – deductivo se fundamenta en su capacidad para ofrecer una aproximación integral y rigurosa al problema de investigación. Esta metodología se alinea con los objetivos de la investigación y se considera la más adecuada para lograr una comprensión profunda y significativa.

2.4.1. Diseño experimental.

Para este ensayo se utilizó un diseño experimental con bloques completamente al azar con 3 tratamientos y 10 repeticiones con 30 unidades experimentales, a un nivel de significancia 0,05 la comparación de los tratamientos de media se realizó mediante la prueba de tukey al 95% de confianza.

Donde:

Variedades

R: Rosado

Tres medios de cultivos:

M1: Medio de cultivo A (MS + AIA 2.5 + KIN 2.5).

M2: Medio de cultivo B (MS + AIA 2.5 + KIN 7.5).

M3: Medio de cultivo C (MS + AIA 2.5 + BAP 2.5).

Tabla N°1 Ubicación de los tratamientos

1	RM1	RM2	RM3
2	RM2	RM3	RM1
3	RM3	RM1	RM2
4	RM1	RM2	RM3
5	RM2	RM3	RM1
6	RM3	RM1	RM2
7	RM1	RM2	RM3
8	RM2	RM3	RM1
9	RM3	RM1	RM2
10	RM2	RM3	RM1

10 repeticiones por tratamiento = 30 unidades experimentales.

2.5.Desarrollo del cultivo

Establecimiento

Los explantes se obtuvieron de los bulbos de ajo de la variedad rosado. Los bulbos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos. Posteriormente, se enjuaga con agua destilada y se seca con papel estéril.

Siembra

Los explantes de yemas apicales se sembraron en los tubos de ensayo de vidrios conteniendo 10 ml de diferentes medios de cultivo esterilizado. Los tubos se sellaron y se incubaron en la cámara de crecimiento a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

Tres medios de cultivo:

M1: Medio de cultivo A (MS + AIA 2.5 + KIN 2.5).

M2: Medio de cultivo B (MS + AIA 2.5+ KIN 7.5).

M3: Medio de cultivo C: (MS + AIA 2.5 + BAP 2.5).

TABLA N°2. Medio de introducción

Fase 1		Inicio		
		M 1	M 2	M 3
Stock / producto	x / unidad	Cantidad ml	Cantidad ml	Cantidad ml
Macro M1	x10	50	50	50
Macro M2	x100	5	25	5
Macro M3	x100	5	5	5
Vitaminas m4	x100	5	5	5
Thiamine 10mg/100ml)	MI	1.5	1.5	1.5
Sulfato adenina 500mg/200ml	MI	16	16	16
Mioinositol (1000mg/100ml)	MI	5	5	5
Azúcar	Gr	16,5	16.5	16.5
Enrazar a	MI	250	250	250
Fraccionar a	MI	250	250	250
AIA (10mg/500ml)	MI	2.5	2.5	2.5
KIN (10mg/500ml)	MI	2.5	7.5	0
BAP (10mg/500ml)	MI	0	0	2.5
Enrazar a	MI	500	500	500
Ph		5.7	5.7	5.7
Agar (10g/l)	Gr	5	5	5

Multiplicación

Después de 8 semanas los brotes obtenidos en la fase de establecimiento se sub cultivaron en nuevos frascos con el mismo medio de cultivo. Se evaluarán las mismas variables que en la fase de establecimiento.

Tres medios de cultivo:

M1: Medio de cultivo A (MS + ANA 9 + KIN 18).

M2: Medio de cultivo B (MS + ANA 12 + KIN 18).

M3: Medio de cultivo C (MS + ANA 12 + BAP 24).

TABLA N°3. Medio de multiplicación

Fase 2		Multiplicación		
		Medio 1	Medio 2	Medio 3
Stock / producto	x / unidad	Cantidad ml	Cantidad ml	Cantidad ml
Macro M1	x10	60	60	60
NaH ₂ P ₄ H ₂ O	Mg	120	120	120
Macro M2	x100	6	6	6
Macro M3	x100	6	6	6
Vitaminas M4	x100	6	6	6
Thiamine (10mg/100ml)	ml	1,8	1.8	1.8
Mioinositol (1000mg/ 2000ml)	ml	6	6	6
Sulfato adenina 500mg/200ml	ml	19,2	19.2	19.2
ANA(10mg/100ml)	ml	9	12	12
KIN (10mg/500ml)	ml	18	18	24
Azúcar	Gr	18	18	18

Enrazar a	Ml	600	600	600
Ph		5,7	5.7	5.7
Agar (6g/l)	Gr	6.6	6.6	6.6
Dispersar	Ml/fr	60	60	60
Nro		10	10	10

2.6. Variables respuestas

- Estado de regeneración de los explantes.
- Numero de hojas.
- Números de plantas.
- Longitud promedio de planta.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Presentación. Análisis e Interpretación de Resultados

Condiciones para la iniciación *in vitro* de ajo y tamaño del explante.

3.2. Fase 1 Establecimiento y regeneración de plántulas

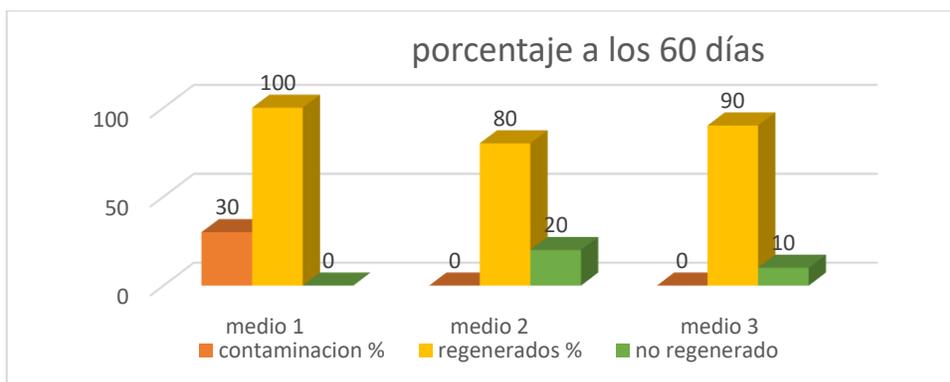
Los resultados obtenidos de regeneración *in vitro*, probando 1 variedad 3 diferentes medios de cultivo y 1 tipo de explante. Se muestran en los cuadros de resultados.

TABLA N°4. Porcentaje de contaminación, regeneración y no regeneración.

Rosado	Meristemos					
	Medio 1	%	Medio 2	%	Medio 3	%
Medios de cultivos						
Explantes sembrados	10		10		10	
Explantes contaminados	3	30	0	-	0	-
Explantes regenerados	10	100	8	80	9	90
Explantes no regenerados	0	0	2	20	1	10

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICA N°1. Porcentaje de contaminación, regeneración y no regeneración



Fuente: Elaboración propia

De acuerdo el resultado mostrado en la tabla 4 y figura 1 podemos decir que si uvo contaminación en el medio 1 un 30% equivale a 3 plantas y en el medio 2 y 3 no uvo contaminación.

También se puede observar en el porcentaje de regeneración el medio 1 fue que tuvo mayores plantas regeneradas con un 100 % y el medio que menos plantas regeneradas fue el medio 2 con un 80 %.

En el estado de no regeneración de las vitroplantas se presentó en el medio2 20% y en el medio3 10% de plantas no regeneradas a los 60 días.

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). en su tesis presentada “Multiplicación de plantas mediante el sistema de cultivo in vitro de tres variedades de ajos (*Allium sativum L*) para la formación de micro bulbillos”. que el porcentaje de regeneración nos indica que tuvieron en el T3 20% plantas contaminadas de 15 plantas y en el T2 tubo el 50 % plantas contaminadas.

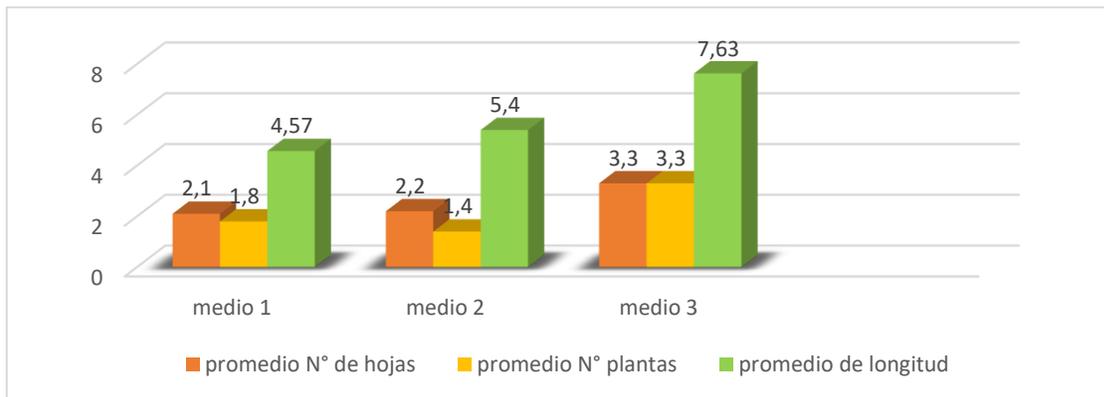
3.3. Promedio de hojas, plantas y longitud

TABLA N°5 Promedio de hojas, plantas y longitud

Medio de cultivos	Medio 1	Media cm	Medio 2	Media cm	Medio 3	Media cm
Explantos sembrados	10		10		10	
Promedio N° hojas	7	2,1	8	2,2	9	3,3
Promedio N° plantas	7	1,8	8	1,4	9	3,3
Promedio de longitud	7	4,57	8	5,4	9	7,63

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICA N°2 promedio de hojas, plantas y longitud



Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a los resultados en la tabla 5 y la gráfica 2 se pudo observar que el medio 3 tuvo la mayor cantidad de hojas con un promedio de 3.33 y el medio que menos obtuvo fue el medio 1 que tuvo un promedio de 2,1.

En el promedio de plantas obtuvimos al medio 3 con mayor cantidad plantas con un promedio de 3,33 y al medio que menos obtuvo fue el medio 2 con un promedio de 1,5 de plantas.

En el promedio de longitud tenemos al medio 3 que se desarrolló más que los demás medios con un promedio de 7,63 cm y al medio que menos de desarrollo fue el medio 1 que tuvo un promedio de 4,57 cm.

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). Comparando los resultados en esa tesis en el número de hoja, tiene una media de 2,57 y 3.0 número de plantas no lo tomo en cuenta. solo de midió la longitud de la planta que tuvo un medio de 7.94 el más mejor y el peor fue de 5.01.

TABLA N°6 (√): regenerado (X): contaminado (□):no regenerado

Tratamientos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	10	Σ	media
M1	√	√	X	√	X	√	√	√	X	√	7	0.7
M2	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	8	0.8
M3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	9	0.9
Σ											24	

Fuente: Elaboración propia

En los resultados del ensayo de muestra en la tabla 6 se determinó que el medio 1 tuvo mayor porcentaje de regeneración con 100% y 3 plantas se contaminaron con el paso del tiempo, segundo del medio 3 que obtuvo del 90% solo una planta no regenero. Y por último fue el medio 2 con un 80% dos plantas no fueron regenerados.

TABLA N°7. ANOVA

Fuente de variación (fv)	Grados de libertad (g.l)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrado medio (C.M)	Relación F (Fc)	FT	
					5%	1 %
Total	29	4,8				
Tratamiento	2	0,2	0,1	0,58	3,35	5,49
Error experimental	27	4,6	0,17			

Fuente: Elaboración propia

Analizando el cuadro la Fc 0.58 es menor que la FT al 5% y al 1%, por lo tanto, según los análisis no existe diferencias significativas entre los distintos tratamientos, en cuanto podemos decir que en los tratamientos no tienen significancia.

TABLA N°8. Número de hojas a los 60 días

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Σ	media
M1	3	2	+	3	+	3	3	3	+	4	21	2.1
M2	3	3	2	4	3	3	3	1	-	-	22	2.2
M3	4	2	5	5	3	3	3	4	4	-	33	3.3
Σ											76	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 8 se muestran los resultados de numero de hojas de los explantes teniendo el valor mayor de hojas en el medio 3 con una media de 3,3 (MS + AIA 2.5 + BAP 2.5)

seguido por el medio 2 con una mediade 2,2 (MS + AIA 2.5+ KIN 7.5)

y por último el medio 1 con un promedio de 2,1 (MS + AIA 2.5 + KIN 2.5).

TABLA N°9. ANOVA

Fuente de variación (fv)	Grados de libertad (g.l)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrado medio (C.M)	Relación F (Fc)	FT	
					5%	1 %
Total	23	19.34				
Tratamiento	2	3.84	1.92	2.63	3,35	5,49
Error experimental	21	15.5	0.73			

Fuente: Elaboración propia

Según los análisis realizados de los tratamientos para número de hojas, tomando en cuenta la Fc es menor a la FT al 5%, y al 1% por la cual implica que no existe diferencias significativas entre los tratamientos utilizados

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). en su tabla de ANOVA existe una alta significación estadística en el número de hojas.

TABLA N°10. Número de plantas a los 60 días

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Σ	media
M1	3	2	+	2	+	2	2	3	+	4	18	1,8
M2	2	2	1	1	2	3	2	1	-	-	14	1,4
M3	4	2	4	8	3	2	2	4	4	-	33	3,3
Σ											64	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 10 se muestran los resultados de numero de plantas el medio 3 tiene un promedio de 3,3 seguido por el medio 1 que tiene un promedio de 1,8 por último témenos al medio 2 con un promedio de 1,4.

TABLA N°11. ANOVA

Fuente de variación (fv)	Grados de libertad (g.l)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrado medio (C.M)	Relación F (Fc)	FT	
					5%	1 %
Total	23	56.34				
Tratamiento	2	21.12	10.56	6.32	3,35	5,49
Error experimental	21	35.22	1.67			

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N°11 ANOVA Se concluye que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ya que la Fc es mayor a la FT al 5 y al 1% rechazamos la hipótesis nula y recurrimos a una comparación de medias.

TABLA N°12. Prueba de tukey

T3	T1	T2	
3.3	1.8	1.4	Valor critic
A	B	B	1,60

Fuente: Elaboración propia

T3 es significativamente diferente al T1 Y T2.

T2 Y T1 no son significativamente diferente entre si.

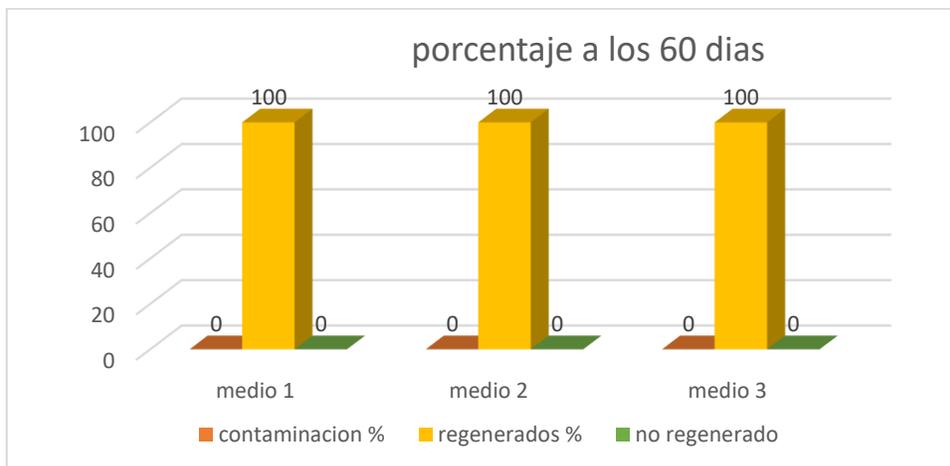
TABLA N°13. Longitud

Tratamiento	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	∑	media
M1	5.0	1.0	+	8.3	+	6.8	9.0	7.6	+	8.0	45.7	4,57
M2	8.3	9.2	4.5	5.0	6.5	10	8.5	2.0	-	-	54	5.4
M3	10,4	9.2	6.0	13.0	7.4	8.2	5.6	9.3	7.2	-	76.3	7.63
∑											176	

Fuente: Elaboración propia

Fuente: Elaboración propia

GRAFICA N°3. Porcentaje de regeneración



Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a la gráfica N°3 nos muestra que no existió ninguna contaminación en la etapa de regeneración ha sido del 100% en los 3 medio de cultivo que se preparó con diferentes dosis de citoquininas y auxinas para regular el crecimiento vegetal de la planta y de los brotes.

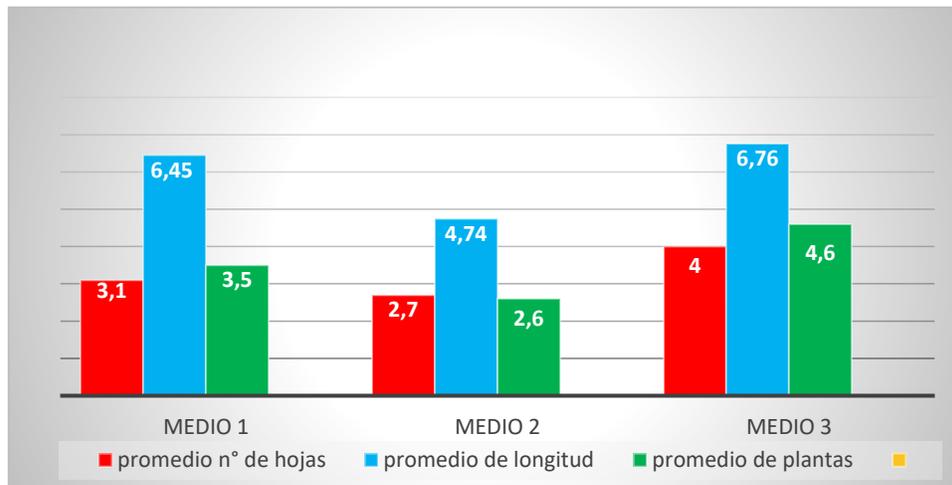
3.5. Análisis de la taza de multiplicación en la etapa II

TABLA N°16 promedio de hojas, longitud y numero de plantas

Medio de cultivos	Medio 1	Media	Medio 2	Media	Medio 3	Media
Explantos sembrados	10		10		10	
Promedio N° de hojas	10	3.1	10	2.7	10	4
Promedio de longitud	10	6.45	10	4.74	10	6.76
Promedio N° de plantas	10	3.5	10	2.6	10	4.6

Fuente: Elaboración propia

GRAFICA N°4



Fuente: Elaboración propia

TABLA N°17. Longitud de plantas:

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	media
M1	7,2	6,2	6,4	7,0	5,6	6,6	6,0	6,2	6,5	6,8	64,5	6,45
M2	4,2	3,6	4,0	3,2	4,8	6,5	5,8	5,2	5,0	5,1	47,4	4,74
M3	6,3	7,0	7,2	6,9	6,1	6,6	7,2	7,2	7,0	6,1	67,6	6,76
Σ											179,5	

Fuente: Elaboración propia

En la gráfica 4 y la tabla 17 nos muestran que el medio 3 tuvo el mejor promedio de longitud de la planta que es de 6,76 seguido por el medio 1 que tuvo un promedio de 6,45 y el medio con menos promedio de longitud de la planta fue el medio 2 con un promedio 4,74 cm.

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). en el trabajo realizado obtuvo los siguientes datos el promedio de longitud fue de 9.66 y el tratamiento con minino fue de 3.79. existe una diferencia con mi trabajo obtenido.

TABLA N°18. ANOVA

Fuente de variación (fv)	Grados de libertad (g.l)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrado medio (C.M)	Relación F (Fc)	FT	
					5%	1 %
Total	29	36,70				
Tratamiento	2	23,67	11.83	24,65	3,35	5,49
Error experimental	27	13,03	0,48			

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla N°18 Se concluye que existe una diferencia significativa entre los tratamientos ya que la Fc es mayor a la Ft al 5 y 1 % rechazamos la hipótesis nula, recurrimos a una prueba de comparación de medias para poder recomendar el mejor tratamiento.

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). nos indica que en la tabla de ANOVA existe diferencia significativamente ente los tratamientos.

TABLA N°19. Prueba de tukey

T3	T1	T2	
6,76	6,45	4.74	Valor critico
A	A	B	0,73

Fuente: Elaboración propia

Cuanto a la longitud de planta la prueba de tukey nos muestra que no existe diferencia entre el tratamiento **T3** 6.76 y **T1** 6.45 ya que los dos tienen la misma letra A.

T2 es significativamente diferente T3 Y T1 ya que tiene la letra B tomando en cuenta la variable de longitud de la planta a los 50 días

TABLA N°20. Número de hojas

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	media
M 1	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	31	3,1
M 2	3	2	3	3	2	3	2	3	3	3	27	2,7
M 3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	40	4
Σ											98	

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N°20 y la gráfica N°4 nos indica que el medio 3 tuvo la mayor numero de hojas con un promedio de 4 y seguido por el medio 1 con un promedio de 3.1 por último tenemos al medio 2 que tuvo el promedio más bajo que es de 2,7 unidades.

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). según en su trabajo de investigación obtuvo el mejor promedio de plantas es de 4.3 y una mínima de 1.8 número de hojas comparando los resultados no ay mucha diferencia con el presente trabajo.

TABLA N°21. ANOVA

Fuente de variación (fv)	Grados de libertad (g.l)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrado medio (C.M)	Relación F (Fc)	FT	
					5%	1 %
Total	29	11,87				
Tratamiento	2	8.87	4,44	40,36	3,35	5,49
Error experimental	27	3	0,11			

Fuente: Elaboración propia

Analizando la tabla N°21 la Fc es mayor a la Ft al 5 y al 1% por lo tanto se concluye que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos por lo que para recomendar en mejor tratamiento se debe realizar una comparación de medias.

Según Falcon Ramos, R. T. (2019). en su tabla de ANOVA se muestran los resultados que es altamente significativo estadísticamente.

TABLA N°22. Prueba de tukey

T3	T1	T2	
4	3,1	2,7	Valor crítico
A	B	C	0,11

Fuente: Elaboración propia.

Cuanto a número de hojas de la planta la prueba de tukey nos muestra que si existen diferencias entre los tratamientos de media **T3** 4. **T1** 3,1. y **T2** 2,7 ya que los 3 tratamientos tienen las letras diferentes.

TABLA N°23. Número de plantas

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	media
M 1	3	6	3	3	4	4	3	3	3	3	35	3,5
M 2	2	4	2	2	3	3	2	4	2	2	26	2,5
M 3	4	5	5	6	5	5	4	4	4	4	46	4,6
Σ											107	

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 6 y figura 3 nos muestran que el medio 3 tuvo el mejor promedio de plantas que es de 4,6 seguido por el medio 1 que tubo u promedio de 3,5 y por último tenemos al medio 2 con un promedio de 2,6 que es el más bajo.

TABLA N°24. ANOVA

Fuente de variación (fv)	Grados de libertad (g.l)	Suma de cuadrados (S.C)	Cuadrado medio (C.M)	Relación F (Fc)	FT	
					5%	1 %
Total	29	39,37				
Tratamiento	2	20,07	10,035	14,05	3,35	5,49
Error experimental	27	19,3	0,71			

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N°24 Se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos ya que F_c es mayor que la F_t al 5 Y 1% rechazamos la hipótesis nula y recurrimos a una nueva comparación de medias para poder recomendar el mejor tratamiento.

TABLA N°25. Prueba de tukey

T3	T1	T2	
4,6	3,5	2,5	Valor crítico
A	B	C	0,91

Fuente: Elaboración propia

Cuanto al número de plantas la prueba de tukey nos muestra que, si existe diferencia significativa entre los tratamientos:

De media 4,6 que corresponde al medio 3 (MS + ANA 12 + BAP 24),

de media 3,5 que corresponde al medio 2 (MS + ANA 12 + KIN 18),

y de media 2,5 que corresponde al medio 1 (MS + ANA 9 + KIN 18),

ya que los 3 tienen diferentes letras a, b, c.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

De acuerdo al comportamiento y desarrollo fisiológico de la planta en base a los resultados obtenidos durante el estudio se puede establecer las siguientes conclusiones:

- Se determinó que el porcentaje de sobrevivencia de los explantes de ajo varía dependiendo al medio de cultivo que se utilizó, para este caso tenemos al medio3 con el 90% seguido tenemos al medio 2 que tuvo el 80% de y por último tenemos al medio 1 con un 70% así podemos encontrar el medio más favorable para la sobrevivencia de los explantes.
- Se establece que el mejor porcentaje de regeneración a los 60 días obtuvo el tratamiento 3 con un porcentaje de 90% que el mejor medio para el porcentaje de regeneración del ajo a los 60 días y para las diferentes variables es muy superior a los demás medios. Al número de hojas y numero de planta tiene una media 3.3 unidades en longitud tiene una media de 7.63 cm. En la fase de multiplicación es igual superior el medio 3 en todas las variables número de hojas con una media de 4 seguido por el medio1 con 3.1 y por último el medio 2 con 2.7, longitud de planta el medio 3 con una media de 6.76 en segundo lugar tenemos al medio1 con una media de 6.45 y en número de plantas en el medio1es de 4.6 seguido por el medio1 es de 3.5 por ultimo el medio 2 con una media de 2.6.
- Se concluye que el mejor medio en la fase de establecimiento fue el medio3 seguido por el medio2 y por último tenemos al medio1. En la fase de multiplicación tenemos al mejor medio que es el 3 seguido al medio 1 por último tenemos al medio 2 en las diferentes variables. En este medio favoreció la tasa de sobrevivencia como el crecimiento adecuado de los explantes siendo recomendada para el futuro protocolo de propagación.

4.2.Recomendaciones

- Se recomienda utilizar el tratamiento M1 y M3 a diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para la obtención de mayores números de micro bulbillos in vitro.
- Tomando en cuenta el trabajo de investigación realizado, evaluar molecularmente la uniformidad genética de los clones propagados in vitro para obtener mayor información genética del cultivo.
- se recomienda utiliza meristemas jóvenes en crecimiento es fundamental para obtener plantas libres de enfermedades.
- La desinfección en los materiales es muy importante para prevenir la contaminación por hongos y bacterias.
- Se recomienda utilizar un medio de cultivo adecuado para cada cultivo que se realice. El medio de cultivo es muy importante para el crecimiento y desarrollo de la planta.
- La temperatura es importante para el desarrollo de la planta es de 22 a 25C° y requiere una buena iluminación.
- Se recomienda seguir con la investigación en las fases posteriores como ser enraizamiento y aclimatación para poder evaluar que el método in vitro si es viable y satisface la necesidad de los productores con semillas sanas y de mayor rendimiento.