



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

169  
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

Inducción, Mantenimiento, Análisis Citológico y Efecto  
del Extracto de Fusarium oxysporum en el Crecimiento de Ca-  
llo de Ajo (Allium sativum L.).

TESIS PROFESIONAL  
que para obtener el título de  
BIOLOGO  
presenta  
CESAR ALBERTO RODRIGO GARCIA

MEXICO, D.F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## TABLA DE CONTENIDO

	PAGINA
I. Introducción.	1
II. Objetivo.	3
III. Revisión de literatura.	
1. Historia del ajo.	5
2. Clasificación botánica.	6
3. Descripción.	7
4. El cultivo del ajo en México.	8
5. Cultivo de tejidos de <u>Allium sativum</u> .	12
6. Estudios de fitotoxinas en cultivo de tejidos vegetales.	15
IV. Metodología.	
1. Fase A. Inducción del callo.	17
2. Fase B. Mantenimiento.	19
3. Fase C. Extracción de la fitotoxina.	21
4. Fase D. Extracto de <u>F. oxysporum</u> en cultivo de callo.	22
V. Resultados.	
1. Fase A. Inducción del callo.	23
2. Fase B. Mantenimiento.	35
3. Fase D. Extracto de <u>F. oxysporum</u> en cultivo de callo.	41
VI. Discusión y conclusiones.	43
VII. Bibliografía.	46
Apéndice A. Producción nacional de ajo.	54
Apéndice B. Composición de los medios MS y BDS.	55
Apéndice C. Modo de preparación del medio MS.	56
Apéndice D. Modo de preparación del medio BDS.	58
Apéndice E. Prueba de rangos múltiples de Kruskal-Wallis.	60
Apéndice F. Prueba de Wilcoxon para dos muestras.	63

## I. Introducción.

El desarrollo de una tecnología alimentaria adecuada es una meta urgente a alcanzar, sobre todo en países como México, en donde el acelerado incremento poblacional exige día a día un aumento cualitativo y cuantitativo de la producción.

Aunado a esto, la dependencia tecnológica del exterior, debido a la carencia de una tecnología propia bien estructurada y la mala administración mantienen al campo mexicano en una constante explotación enfocada a satisfacer intereses extranjeros y dejando para el pueblo mexicano los abastos de más baja calidad alimentaria.

En el área hortícola y en específico para el ajo (Allium sativum) el problema es aún más marcado, como se menciona en la sección dedicada al cultivo de ajo en México.

Es pues urgente desarrollar técnicas propias de estudio y producción que incluyan a aquellas que faciliten la obtención de plantas de interés económico con características deseables para el campesino, para el ama de casa, para la economía nacional e incluso para el mercado de exportación.

Una de estas técnicas es el cultivo de tejidos vegetales (c.t.v.) que aunque ha presentado algunas limitaciones en cuanto a las posibilidades reales que en un principio se le atribuían, si ha podido conseguir logros importantes de aplicación agrícola

sobre todo en las áreas de propagación y fitopatología. Ejemplo de ello son las múltiples industrias que cada día ocupan más el c.t.v. en la producción en países como Estados Unidos, Israel, Inglaterra, Unión Soviética y otros.

En ajo, el cultivo de tejidos, a pesar de estar poco estudiado, proporciona una serie de ventajas en cuanto a los intentos de mejoramiento del cultivo, dado que se trata de una planta agámica y tiene serios problemas de pérdida de calidad por la adquisición de enfermedades, imposibles de resolver por métodos tradicionales y que requieren de nuevas técnicas que permitan estudios de fertilidad floral, hibridización, fitopatología, micropropagación masiva y metabolitos secundarios.

Los problemas más importantes a resolver en ajo son: lograr plantas fértiles, obtener plantas con bulbos más grandes, con resistencia a patógenos y tolerantes a condiciones medio ambientales adversas, utilizar con ventajas los metabolitos secundarios que el ajo produce y propagar la mayor cantidad de plantas sanas al más bajo costo.

Si bien es cierto que no es posible resolver en un par de años los problemas en el ajo, si es posible iniciar el interés en este tipo de estudios y sentar las bases de un desarrollo posterior adecuado.

Sea pues éste, el intento de la tesis.

## II. Objetivos.

De inmediato:

Establecer el medio de cultivo y la concentración de reguladores vegetales más adecuada para la inducción de callo de ajo (Allium sativum L.) de la variedad Morado Chileno.

Determinar el tiempo de inducción de callo.

Analizar las características citológicas de los callos obtenidos.

Establecer el medio de cultivo y la concentración de reguladores vegetales más adecuada para el mantenimiento de callo.

Analizar las características citológicas de los callos en el mantenimiento.

Conocer los efectos causados por el extracto de Fusarium oxysporum en el crecimiento de callos en cultivo semisólido.

A mediano plazo:

Establecer técnicas adecuadas de cultivos celulares, micro propagación y cultivo de haploides.

Montar un sistema para estudios cariológicos y de infección viral en callos y plantas regeneradas.

Analizar las características citológicas, cariológicas y de metabolitos secundarios producidos por fitotoxinas en cultivo.

Practicar la selección in vitro.

Intentar la hibridización somática para conseguir la fertilidad floral.

A largo plazo:

Obtener plantas de ajo sanas, fértiles y de buen aspecto de mercado.

Implementar los medios de distribución a gran escala de estas plantas.

Promover la creación de estudios de ésta índole.

### III. Revisión de literatura.

#### 1. Historia del ajo.

Existe alguna controversia acerca del origen exacto del ajo, algunos lo atribuyen al sur de Europa (Japón, 1984) y otros al Asia Occidental. Sin embargo, la mayoría de los autores apoyan esta última idea basados en la existencia de una especie de ajo silvestre (Allium longicuspis Regel) que crece en Asia y a partir de la cual se cree que derivan todas las variedades actualmente comerciales (Novak, 1972; García, 1973).

El consumo de ajo como alimento y como planta medicinal es bastante antiguo, incluso los griegos y romanos ya lo consumían ampliamente, al grado que Plinio escribe en sus notas que el ajo y la cebolla deben ser considerados deidades (Morell, 1977).

En América, el ajo se introdujo poco después de la conquista, principalmente en Centro y Sudamérica. En México, los indígenas rápidamente se familiarizaron con él y su uso se difundió en todo el país como planta medicinal.



## III. Revisión de literatura.

## 2. Clasificación botánica.

Reino	Vegetal
División	Anthophyta
Clase	Monocotyledonae
Subclase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<u>Allium</u>
Especie	<u>A. sativum</u> L.

(Lawrence, 1951)

El género está formado por unas 250 especies distribuidas en regiones templadas y frías en todo el mundo. Muchas especies son cultivadas y poseen un alto valor económico como A. cepa (cebolla), A. porrum (poro) y por supuesto A. sativum (ajo) (Sánchez, 1980).

### III. Revisión de literatura.

#### 3. Descripción.

El ajo es una planta herbácea y bulbosa. Presenta hojas simples, alternas, paralelinerves y dispuestas en dos hileras. El tallo verdadero es la base del bulbo, su altura va desde 0.5 hasta 1.5 cm y su ancho es de 1.5 a 2 cm. El tallo falso se constituye de vainas cilíndricas las cuales forman catáfilas que protegen a dientes y bulbo.

La raíz es de origen caulógeno y fibrosa, ésta se extiende lateralmente en la capa del suelo y profundiza desde 5 hasta 50 cm.

La flor posee seis estambres libres entre sí, insertos en la base de los tépalos, con las anteras oblongas. El ovario es trilocular con dos ovúlos en cada cavidad, tiene un estilo corto y un estigma pequeño (Sánchez, 1980).

Posee un número diploide ( $2n$ ) de 16 cromosomas. La reproducción sexual está omitida a causa de esterilidad polínica que se atribuye a la degeneración del tejido esporógeno a diferentes niveles de desarrollo de la antera, pero ésto aún no es muy claro (Novak, 1972).

### III. Revisión de literatura.

#### 4. El cultivo del ajo en México.

México es considerado uno de los países más importantes en la producción de ajo en el mundo. El cultivo se realiza básicamente para consumo como alimento; se siembra principalmente en la región del Bajío, en los estados de Guanajuato y Aguascalientes (López, 1978).

Existe alguna confusión respecto al análisis de mercado del ajo, la Dirección General de Economía Agrícola (D.G.E.A., 1982) señala que la producción para 1982 fué de 33677 t, de las cuales 22136 se utilizaron para consumo interno (Veánse tablas 1 y 2 en el apéndice A), quedando, por tanto sólo 11541 t para exportación. Sin embargo, Zavala (1984) menciona que la producción para 1982 fué de 47000 t, de las cuales el 50% se utilizó para exportación a los Estados Unidos, Brasil y países del Caribe.

Esta discrepancia en los datos puede explicarse con el aumento de la privatización de la producción agrícola del ajo, con capital extranjero (Hernández, 1980) y que no aportan sus datos a la producción total. Esto es evidente en estados como Querétaro y Guanajuato donde día a día aumentan las plantas deshidratadoras de ajos destinados exclusivamente a la exportación.

Basados exclusivamente en datos estatales (D.G.E.A., 1982), que describen más fielmente las condiciones del campesino independiente, observamos una marcada disminución en la superficie cosechada de 1979 a 1982 lo que redujo en una baja en la producción total. En este sentido se reportan en la literatura una serie de problemas que explican la situación y que hacen del ajo un cultivo poco interesante para el campesino que no dispone de asesoría adecuada.

Quizás el principal problema es el mercadeo de la cosecha, por las caídas que sufre el precio continuamente, a consecuencia de la disminución en calidad y al poco cuidado que se tiene para superar esta situación.

La disminución en la calidad se debe a factores claramente definidos. En primer lugar, como se mencionó anteriormente, el ajo presenta flores abortivas, la reproducción se efectúa de forma vegetativa mediante la plantación de dientes. Sin embargo, a medida que transcurren los subcultivos, la calidad de la planta se pierde debido a una mala elección de la simiente y principalmente, a que los bulbos adquieren enfermedades que se continúan de cultivo en cultivo.

Las principales plagas y enfermedades del ajo en México son: nemátodos (Tylenchidae; Ditylenchus dipsaci (Kuhn) Filipjev), trips (Tisanoptera; Thrips tabacii), pudrición del bulbo (Deuteromycotina; Fusarium oxysporum Schlecht), mancha

púrpura (Deuteromycotina; Alternaria porri) y pudrición suave (Deuteromycotina; Erwinia sp.).

Las medidas adoptadas para combatirlas son la rotación de cultivos, el uso de pesticidas y el uso de las variedades resistentes. No obstante el esfuerzo realizado aún no se logra erradicar el problema (Garza, 1972; González, 1978; Obeso, 1980; Japón, 1984).

Las variedades utilizadas en México las podemos dividir en dos grandes grupos: ajo blanco y ajo morado.

El ajo blanco es tardío y muy productivo. Sus dientes, como su nombre lo indica, son blancos y están recubiertos por catáfilas apergaminadas de color plateado. El ajo blanco es generalmente mayor que el morado. Se manejan las variedades Cristal (sólo para exportación), Perla y Criollo.

El ajo morado, así denominado porque las catáfilas que recubren la cabeza y los dientes tienen un tono morado, es más temprano que el blanco pero de conservación más difícil. Se cultivan las variedades Chileno y Criollo. En 1974 el campo agrícola experimental del Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, obtuvo tres nuevas variedades moradas: Masson, Napuri y Pata de Perro (Obeso, 1980).

La producción de ajos de características adecuadas y de mejor calidad podrían solucionar muchos de los problemas mencionados e incluso permitirían competir adecuadamente en el

campo de la exportación, en el cual, con las condiciones actuales es prácticamente imposible colocar al producto.

El mercado internacional es muy competido y exigente desde el punto de vista cualitativo. En Europa, por ejemplo, este mercado está protegido por normas muy estrictas y por un arancel del 12% ad valorem. La demanda es exclusivamente de ajos de dientes grandes y calibrados, los ajos deben estar sanos, firmes, limpios, exentos de daños provocados por heladas, sol o maquinaria, exentos de moho o gérmenes visibles y no deben tener olor o sabor extraños ni humedad exterior anormal. Se exige además ajos de la variedad Morado Chileno de la zona de Celaya, la cual tiene buena imagen en el mercado (I.M.C.E., 1974; I.M.C.E., 1979a; I.M.C.E., 1979b).

En países como Argentina y Egipto desde la década pasada se han implementado programas tecnológicos enfocados al aumento de la calidad del ajo producido, que incluye técnicas de cultivo de tejidos (Nome, et. al., 1981) desplazando con ventajas al ajo mexicano en el mercado internacional.

### III. Revisión de literatura.

#### 5. Cultivo de tejidos de Allium sativum.

i) Cultivo de meristemos. Los primeros proyectos formales en cultivo de tejidos de ajo se llevaron a cabo a principios de la década anterior y estuvieron enfocados a obtener plantas libres de virus por medio del cultivo de meristemos.

En 1972, los franceses J. Quiot, C. Messiaen y J. Leroux logran obtener plantas sanas a partir de meristemos de plantas infectadas en un 8.3% de los casos, utilizando una modificación del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y distintas combinaciones de ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y otros compuestos.

Con el transcurso de las investigaciones el porcentaje fue mejorando. Así en 1981, Nome y colaboradores consiguen un 28.6% de plantas sanas en el medio MS con 1 ppm de ANA. Para 1985, este mismo grupo (Conci, et. al., 1985) consigue un 88% de plantas sanas con MS + ANA (0.1 mg/l) + cinetina (K) (0.1 mg/l).

ii) Inducción de callo y estudios cariológicos. En 1973, P. Havranek y F.J. Novak, consiguen por vez primera la inducción de callo a partir de tejido foliar utilizando el medio MS + ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (1 mg/l) + ácido indolacético (AIA) (2mg/l) + K (2 mg/l). Determinaron además

que esta triple combinación de reguladores es necesaria para la formación de callo. En el análisis microscópico se observó un callo muy irregular en cuanto a sus características citológicas y cariológicas con la presencia de una gran cantidad de células protraqueales y células poliploides.

Novak utilizó este callo como modelo para múltiples investigaciones. En 1974 analizó los cambios cromosómicos en callo en relación con la edad del cultivo. Para 1984 (Novak y Dolezel tienen perfectamente caracterizados los fenómenos fenotípicos tanto de callos como de plantas regeneradas (Novak, 1980, 1981; Dolezel y Novak, 1984) y se logró la diferenciación de células tetraploides con la ayuda de colchicina (Novak, 1983).

En un reporte reciente Dolezel y Novak (1985) mencionan que la heterogeneidad cariológica disminuye cuando las concentraciones de 2,4-D y K en el medio son equimolares.

iii) Diferenciación. El primer reporte de diferenciación a partir de callo de ajo se publicó en 1976 cuando Kehr y Schaeffer lograron la rediferenciación de plantas en el medio MS + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l).

Abo El-Nil (1977), utilizando un medio especial (AZ) logró la organogénesis con AIA (10  $\mu$ M) + K (20  $\mu$ M).

Novak (1980) observó que la habilidad organogenética depende de la duración del callo en cultivo con 2,4-D y que la



máxima frecuencia de regenerantes aparece alrededor de los 80 días en un medio con AIA (2 mg/l) + K (2 mg/l).

Bhojwani (1980) utilizó el medio B5 (Gamborg, et al., 1968) + 2-isopentenil adenina (2-ip) (0.5 mg/l) + ANA (0.1 mg/l) para la organogénesis con excelentes resultados en cuanto a la formación de brotes y posteriormente en las características del bulbo de las plantas regeneradas (Bhojwani, et al., 1982). Entre sus observaciones Bhojwani encontró la presencia de partículas virales en los callos obtenidos pero no en las plantas regeneradas.

Poco después, Novak, Havel y Dolezel (1982) mencionaron que la utilización del BDS (Dunstan y Short, 1977) resultaba más conveniente que el MS tanto para la inducción de callo como para la diferenciación. Estos autores sustituyen al MS por el BDS en todos sus proyectos en Allium (Novak, et al., 1985), aunque otros investigadores no dejan de experimentar diferentes medios (Mossella y Fernández, 1985).

### III. Revisión de Literatura.

#### 6. Estudios de fitotoxinas en cultivo de tejidos vegetales.

Se definen a las fitotoxinas como metabolitos secundarios con peso molecular menor a 2000 Daltons y que pueden perturbar el crecimiento normal de las plantas superiores. La mayoría de las fitotoxinas pueden inhibir el crecimiento y desarrollo, pero algunas lo estimulan a ciertas concentraciones (Walton y Earle, 1984).

Las investigaciones de interacción de las fitotoxinas con cultivos in vitro representan hasta ahora un área modesta de estudio pero en gran expansión, dado que permite, entre otras cosas, evaluar la acción de las fitotoxinas en el proceso de adquisición de enfermedades, conocer los mecanismos bioquímicos involucrados y practicar la selección in vitro (Earle, 1978). A la fecha existe alrededor de una docena de publicaciones que mencionan la adquisición de cultivos resistentes a efectos de fitotoxinas por medio de c.t.v. (vease Hammerschlag, 1984).

En fitotoxinas de origen fúngico los estudios se han enfocado principalmente a los generos Helminthosporium (Earle, 1978), Fusarium (Behnke, 1980) y Phytophthora (Behnke, 1979).

En particular en F. oxysporum se ha encontrado la existencia de una fitotoxina, el ácido fusárico (ácido 5-n-butil-

piridín-2-carboxílico) cuyos efectos son similares al del CCCP (cianuro de carbonil m-clorofenil hidrazona).

El ácido fusárico inhibe la acción de ciertas enzimas que contienen metales (vg. citocromo oxidasa) y depolariza la membrana plasmática, lo cual produce una disminución en el ATP celular. Estas alteraciones del potencial eléctrico de la membrana ocurren a concentraciones mayores a  $10^{-5}$  M y sólo a concentraciones arriba de  $10^{-4}$  M se inhibe la respiración mitocondrial. El mecanismo bioquímico es hasta ahora desconocido (Arias, 1985).

Hasta la fecha no se han realizado estudios de fitotoxinas en cultivos in vitro de Allium sativum por lo que esta área se encuentra en espera de ser investigada.

#### IV. Metodología.

##### 1. Fase A. Inducción del callo.

###### i) Preparación de medios.

A: MS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l)

B: MS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (2 mg/l) + K (2 mg/l)

C: BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l)

D: BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (2 mg/l) + K (2 mg/l)

- pH 5.8, ajustado con HCl y/o NaOH 1M.

- Esterilización:  $1.3 \text{ Kg/cm}^2$ , 121°C, 15 min.

- 92 frascos totales (23 por tratamiento) con 10 ml de medio cada uno.

- La composición de los medios y su modo de preparación se especifican en los apendices B, C y D.

###### ii) Preparación del material biológico

Dientes de ajo desprovistos de catáfilas de la variedad Morado Chileno cultivados en el Valle de Celaya, Guanajuato fueron sometidos al siguiente tratamiento.

- Pretratamiento: lavado en flujo de agua corriente, 24 horas, para evitar la presencia de inhibidores hidrosolubles.

- Desinfección (en campana de flujo laminar): etanol 70%, 30 segundos, hipoclorito de sodio comercial (Cloralex), 10 minutos, etanol 70%, 30 segundos, agua destilada estéril, 8 enjuagues.

## iii) Siembra.

Se disectaron los dientes primero transversal y luego longitudinalmente hasta exponer el ápice meristemático que se cortó en su base tratando de incluir uno o dos primordios foliares.

Ya extraídos se colocaron en los medios previamente preparados, una pieza por frasco.

## iv) Incubación.

Oscuridad,  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 28 días.

## v) Medidas de evaluación.

- Determinación del porcentaje de inducción de callo cada dos días.

- Peso fresco y seco de los callos obtenidos a los 28 días, con exclusión de partes visiblemente diferenciadas.

- Evaluación de las diferencias significativas en peso fresco basado en la prueba de rangos múltiples de Kruskal-Wallis (Apéndice E).

## vi) Observaciones microscópicas.

Porciones de callo se tiñeron con azul cresil brillante 0.05% y se observaron al microscopio óptico.

#### IV. Metodología.

##### 2. Fase B. Mantenimiento.

###### i) Preparación de los medios.

MA: BDS + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l)

MB: BDS + AIA (2 mg/l) + K (0.5 mg/l)

MC: BDS + AIA (2 mg/l) + K (2 mg/l)

MD: BDS + 2,4-D (0.5 mg/l) + AIA (0.5 mg/l) + K (0.5 mg/l)

ME: BDS + 2,4-D (0.5 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l)

MF: BDS + 2,4-D (0.5 mg/l) + AIA (2 mg/l) + K (2 mg/l)

MG: BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l)

MH: BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (2 mg/l) + K (2 mg/l)

-pH y esterilización igual que en la fase A.

- 40 frascos en total (5 por tratamiento) con 10 ml de medio cada uno.

###### ii) Material biológico.

Se utilizaron callos de 22 días de edad crecidos en un medio BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l) mantenidos en la obscuridad a  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

###### iii) Resiembra.

Se tomaron porciones de callo de aproximadamente 4 mm en su diámetro mayor y cuidando excluir regiones visiblemente di

ferenciadas. Se colocó una pieza por frasco.

iv) Incubación.

Oscuridad,  $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 22 días.

v) Medidas de evaluación.

Peso fresco y seco de los callos a 22 días.

Evaluación de diferencias significativas en el peso fresco basado en la prueba de rangos múltiples de Kruskal- Wallis (apéndice E).

vi) Observaciones microscópicas.

Similar a la fase A.

#### IV. Metodología.

### 3. Fase C. Extracción de las fitotoxinas.

#### i) Material de procedencia.

Cepa de Fusarium oxysporum proporcionada por el Instituto de Biología de la U.N.A.M., cultivada a 24°C en un medio de papa-dextrosa agar (PDA; 35.14 g de papas cocidas picadas, 1.75 g de dextrosa y 2.11 g de agar por cada litro de agua).

#### ii) Cultivo previo.

Hifas de F. oxysporum se colocaron en medio BDS sin agar en incubación a 26°± 1°C durante 7 días. Se prepararon un total de 10 tubos de ensaye con 10 ml de medio cada uno.

#### iii) Extracción (basado en Walton y Earle, 1984).

- Filtración de 100 ml de cultivo en papel Whatman No. 1.
- Adición de 100 ml de etanol al 80%.
- Reposo de 72 horas.
- Filtración en papel Whatman No. 1.
- Concentración por liofilización hasta reducir a 120 ml.



#### IV. Metodología.

##### 4. Fase D. Extracto de F. oxysporum en cultivo de callo.

###### i) Preparación de los medios.

EE: BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l).

EF: BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l) +  
extracto de F. oxysporum (Fo) 20%.

- pH y método de esterilización igual que en la fase A,  
con excepción del Fo que se esterilizó por ultrafiltración al  
vacío (Millipore, malla 0.45  $\mu$ m) y se agregó al medio de cul-  
tivo en condiciones estériles antes de la gelificación ( $\approx 40^{\circ}\text{C}$ ).

###### ii) Material biológico.

Se utilizaron callos de 66 días de edad, mantenidos en un  
medio BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l) en la  
obscuridad a  $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

###### iii) Incubación.

Oscuridad,  $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 22 días.

###### iv) Medidas de evaluación.

- Peso fresco de los callos a los 22 días.

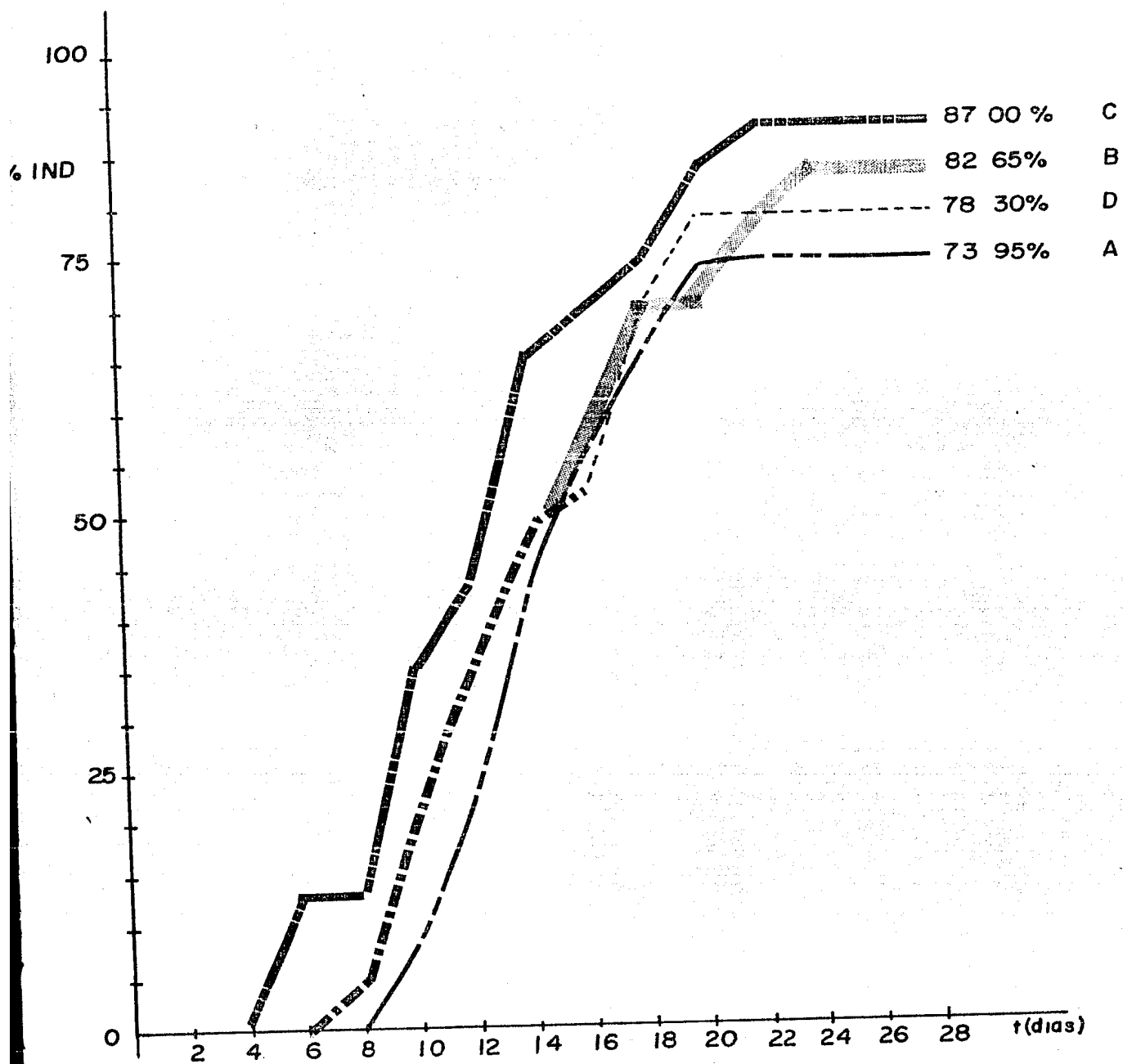
- Evaluación de las diferencias significativas en peso  
fresco basado en la prueba de Wilcoxon (apéndice F).

## V. Resultados

## 1. Fase A. Inducción del callo.

Tabla 1. Porcentaje de inducción de callo vs tiempo de la prueba.

Tratamiento	A	B	C	D
Días				
4	-	-	-	-
6	-	-	13.05	-
8	-	4.35	13.05	4.35
10	8.70	21.75	34.80	21.75
12	21.75	34.80	43.50	34.80
14	43.50	47.85	65.25	47.85
16	55.55	55.55	69.60	52.20
18	65.25	69.60	73.95	69.60
20	73.95	69.60	82.65	78.30
22	73.95	78.30	87.00	78.30
24	73.95	82.65	87.00	78.30
26	73.95	82.65	87.00	78.30
28	73.95	82.65	87.00	78.30



GRAFICA I. Porcentaje de induccion de Calto vs tiempo de la prueba

A    ————  
 B    ▨▨▨▨▨▨  
 C    —●—●—●—  
 D    - - - - -  
 BD    - · - · - · - ·

Tabla 2. Peso fresco y seco (mg) de los callos obtenidos por explante a los 28 días en los distintos tratamientos.

Tratamiento	A		B		C		D	
	F	S	F	S	F	S	F	S
01	199	014	171	011	227	019	179	010
02	081	009	141	013	214	016	144	007
03	063	010	086	004	125	006	122	009
04	055	002	085	006	122	009	072	002
05	051	010	075	008	088	007	070	006
06	051	009	073	006	086	006	067	005
07	049	009	073	006	085	005	066	004
08	039	007	070	005	083	003	049	003
09	038	009	067	004	081	004	048	002
10	038	007	063	005	077	005	037	002
11	032	005	063	003	072	005	031	004
12	032	006	053	004	067	006	030	002
13	028	006	049	004	061	005	029	001
14	027	005	042	003	053	004	028	001
15	025	005	041	003	052	003	026	002
16	021	004	040	004	048	005	019	001
17	019	004	037	002	042	004	013	001
18	000	000	032	002	037	004	007	001
19	000	000	015	001	034	002	000	000
20	000	000	000	000	032	004	000	000
21	000	000	000	000	000	000	000	000
22	000	000	000	000	000	000	000	000
23	000	000	000	000	000	000	000	000

Clave: A, B, C y D veáse metodología, Fase A.

F: Peso fresco.

S: Peso seco.

Tratamiento A: Rango (r) = 180

Tratamiento B: Rango (r) = 156

$$\bar{X}_{pf} = 49.88$$

$$\bar{X}_{ps} = 7.12$$

$$S_{pf} = 41.73$$

$$S_{ps} = 2.96$$

$$S_{ps}$$

$$\bar{X}_{pf} = 68.36$$

$$\bar{X}_{ps} = 4.95$$

$$S_{ps} = 35.55$$

$$S_{pf} = 3.01$$

$$S_{ps}$$

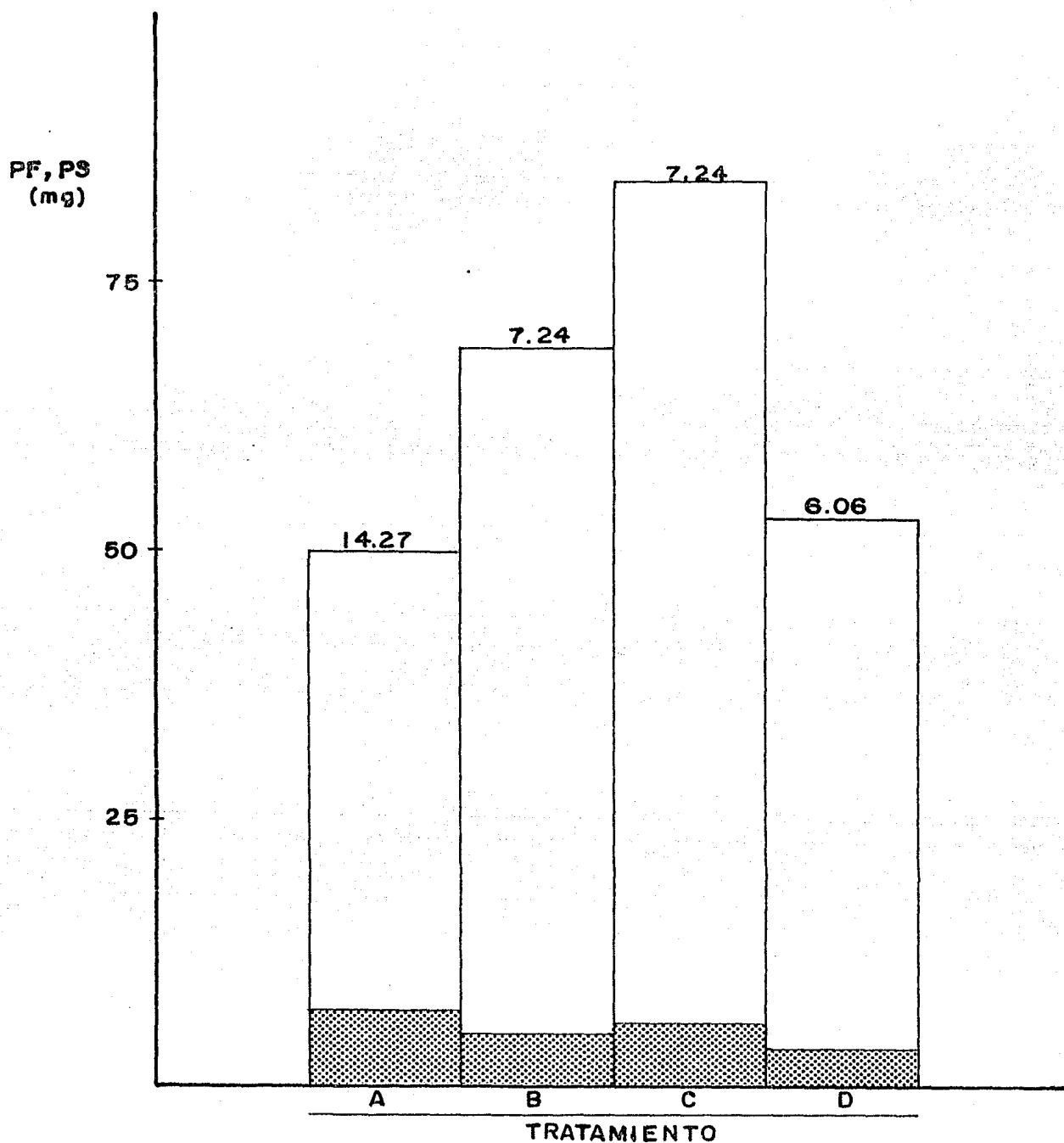


FIGURA I. Peso fresco  y peso seco  (mg) promedio de los callos obtenidos a 28 días en los distintos tratamientos. EL numero arriba de la barra indica el porcentaje de peso seco promedio con respecto al peso fresco.

Tratamiento C: Rango (r) = 195      Tratamiento D: Rango (r) = 172

$$\bar{X} = 84.30$$

$$\bar{X}^{pf} = 6.10$$

$$S^{ps} = 53.29$$

$$S^{pf} = 4.21$$

ps

$$\bar{X} = 57.72$$

$$\bar{X}^{pf} = 3.50$$

$$S^{ps} = 46.94$$

$$S^{pf} = 2.83$$

ps

- Respuesta morfogenética a los 28 días:

A, B, C y D; callo amarillo, consistente, poco friable y con olor ligeramente agrio. Este callo no permite el establecimiento de cultivos celulares.

Tabla 3. Asignación de rangos para la prueba de Kruskal-Wallis, basado en la tabla 2 (peso fresco), (veáse apéndice E).

Tratamiento:	A	B	C	D
	9.5	9.5	9.5	9.5
	9.5	9.5	9.5	9.5
	9.5	9.5	9.5	9.5
	9.5	9.5	34.5	9.5
	9.5	21.0	37.0	9.5
	9.5	34.5	39.0	19.0
	22.5	39.0	46.5	20.0
	24.0	44.0	48.5	22.5
	25.0	45.0	55.0	26.0
	27.0	46.5	56.5	28.5
	28.5	51.0	59.0	30.0
	34.5	56.5	65.0	31.0
	34.5	61.0	69.5	32.0
	41.5	61.0	74.0	39.0
	41.5	65.0	75.5	48.5
	43.0	67.5	77.0	51.0

Tratamiento:	A	B	C	D
	51.0	71.5	78.5	63.0
	53.5	71.5	80.5	65.0
	53.5	73.0	82.0	67.5
	58.0	78.5	83.5	69.5
	61.0	80.5	85.0	83.5
	75.5	86.0	91.0	87.0
	90.0	88.0	92.0	89.0
Rj =	821.5	1179.0	1358.0	1019.5

Resultado del análisis de Kruskal-Wallis:

$$H = 12.528101$$

$$H' = 12.626277$$

Existen diferencias significativas en los resultados de peso fresco para los tratamientos utilizados con una probabilidad del 99% ( $H_{tablas} = 11.345$ ).

Comparación múltiple:

Número de comparaciones = 6

$$1) A \text{ vs } B \quad |821.5 - 1179.0| = 357.5$$

$$2) A \text{ vs } C \quad |821.5 - 1358.0| = 536.5$$

$$3) A \text{ vs } D \quad |821.5 - 1019.5| = 198.0$$

$$4) B \text{ vs } C \quad |1179.0 - 1358.0| = 179.0$$

$$5) B \text{ vs } D \quad |1179.0 - 1019.5| = 159.5$$

$$6) C \text{ vs } D \quad |1358.0 - 1019.5| = 338.5$$

$$q(0.01, 4, \infty) = 4.403$$

$$4.403 \times 31 = 136.493$$

por lo tanto

A  $\neq$  B

A  $\neq$  C

A  $\neq$  D

B  $\neq$  C

B  $\neq$  D

C  $\neq$  D

Orden de efectividad a 99% de probabilidad en la inducción de callo en los distintos tratamientos, evaluada en peso fresco obtenido:

C > B > D > A

Observaciones microscópicas. Tomando las porciones del callo formado y observando del centro hacia afuera encontramos los siguientes tipos celulares. Células protraqueales (denominadas así por Havranek y Novak (1973) agrupadas en racimos y que se distribuyen hacia las orillas formando ramificaciones (Figura 2), células indiferenciadas tipo parenquima con formas poliédricas (Figura 3) a irregulares (Figura 4), células protraqueales aisladas en células de tipo parénquima, hacia la orilla células gigantes indiferenciadas (Figuras 5, 6 y 7) fácilmente



disgregables en grupos aislados (Figura 8). Se observan también células de tipo parénquima libres en pequeños y medianos agregados (Figuras 9 y 10).

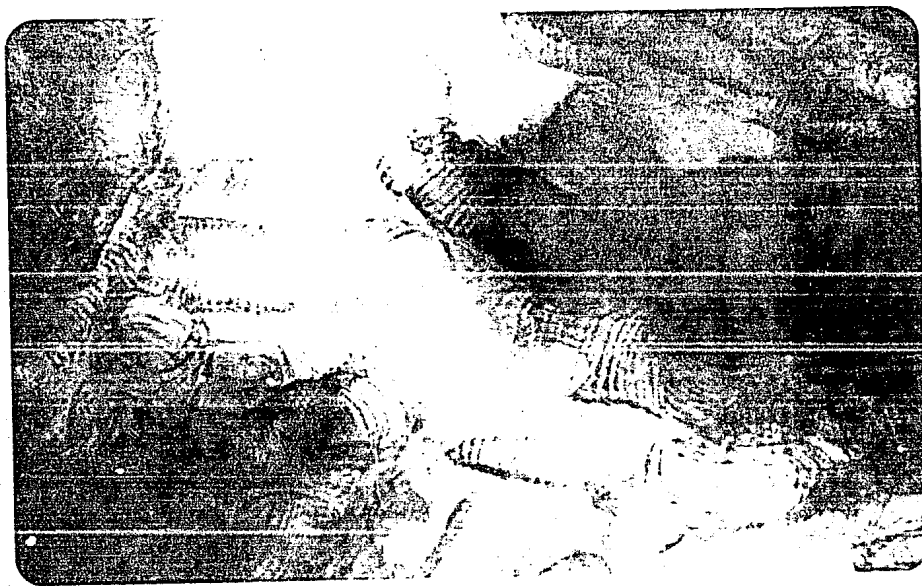


Figura 2. Células protraqueales agrupadas en racimos en la por  
ción central del callo (amplitud 51.2x).

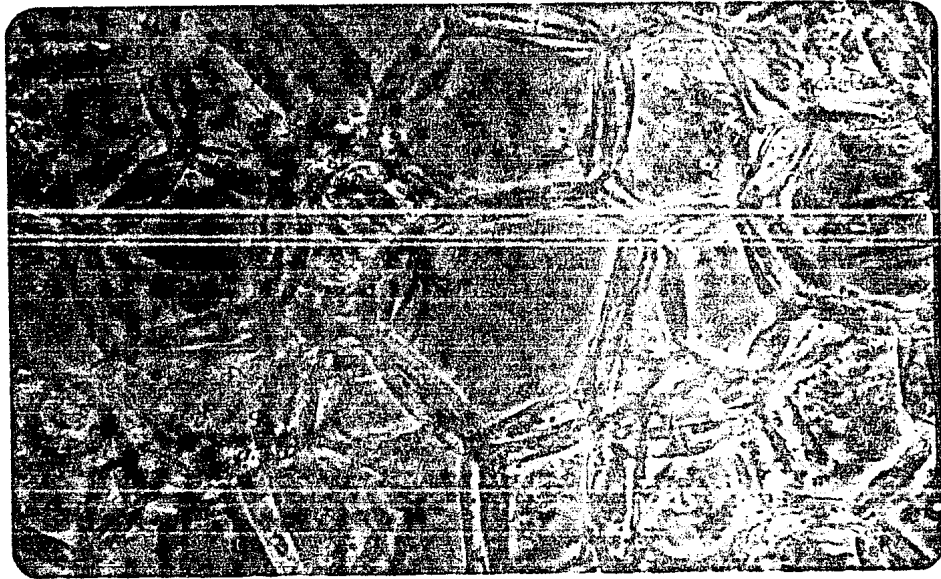


Figura 3. Células indiferenciadas tipo parénquima con formas poliédricas (amplitud 128x).

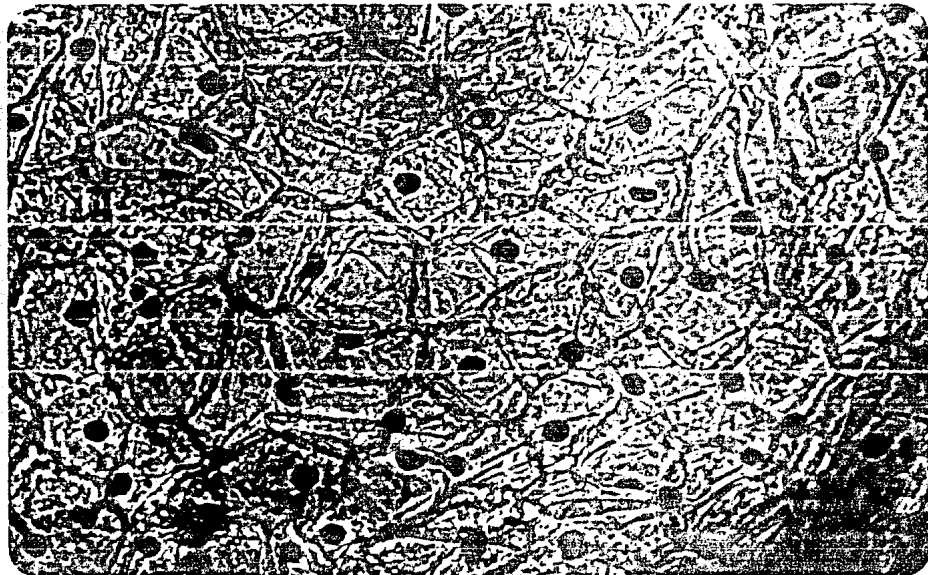


Figura 4. Células indiferenciadas con formas irregulares (amplitud 128x).



Figura 5. Célula indiferenciada gigante en los límites del ca  
llo (amplitud 64x).

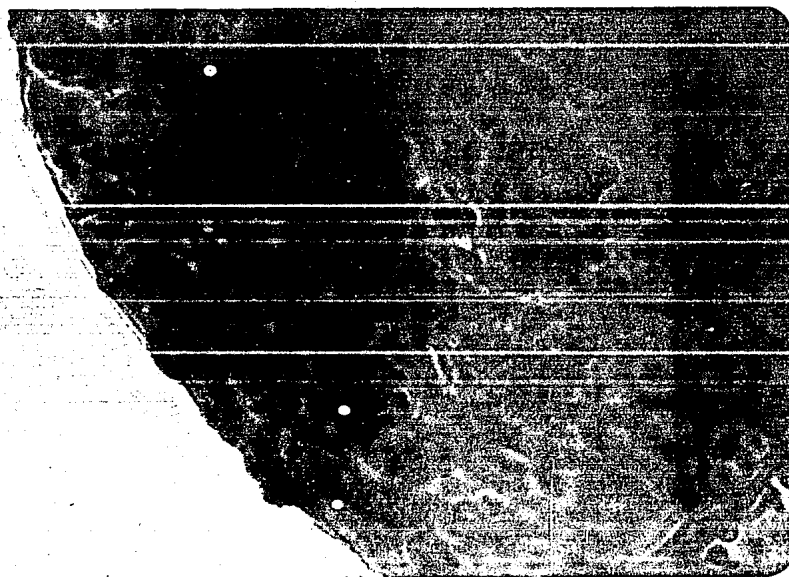


Figura 6. Acercamiento de la figura 5 (amplitud 256x).



Figura 7. Célula indiferenciada gigante en los límites del callo (amplitud 128x).

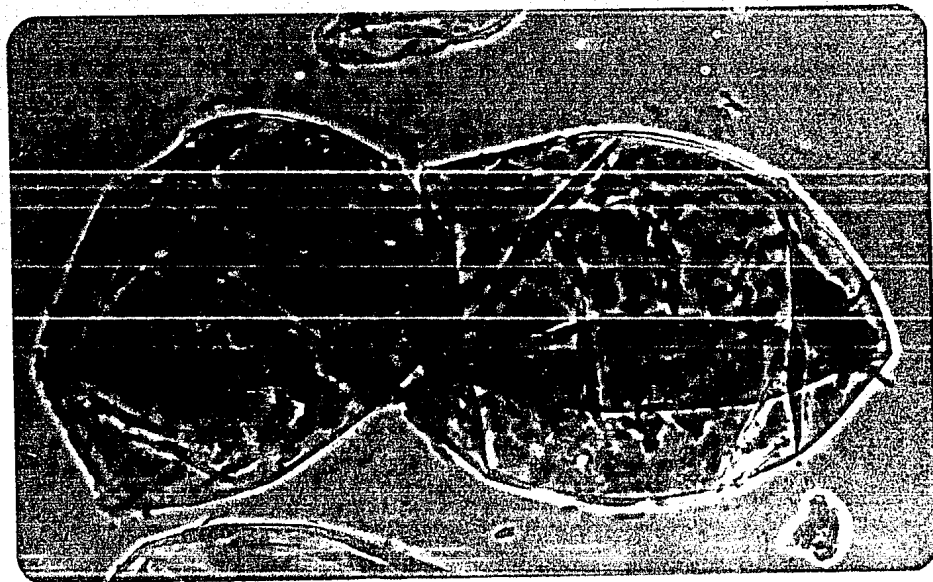


Figura 8. Células indiferenciadas gigantes aisladas alrededor del callo (amplitud 128x).

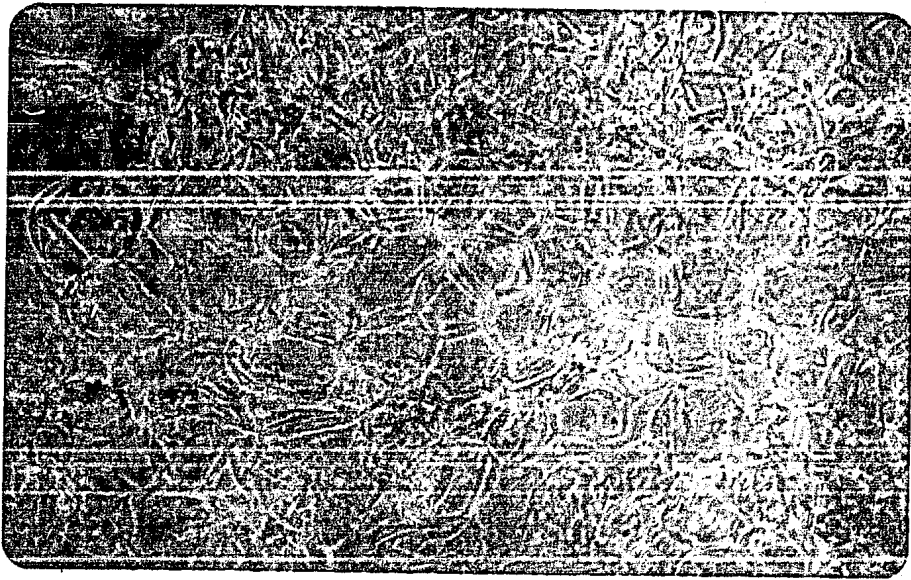


Figura 9. Agregado de células indiferenciadas tipo parénquima alrededor del callo (amplitud 51.2x).

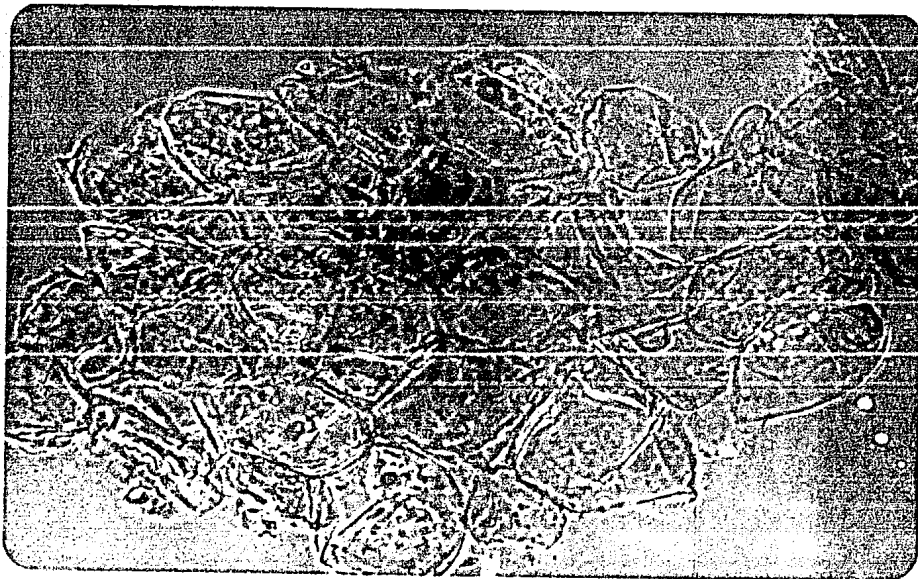


Figura 10. Agregado de células indiferenciadas tipo parénquima libre alrededor del callo (amplitud 128x).

## V. Resultados.

### 2. Fase B. Mantenimiento.

#### Respuesta Morfogenética.

Medio MA: Callo blanco, formación de brotes incoloros de 0.1 a 1 mm de longitud.

MB: Callo blanco, formación de brotes incoloros de 0.1 a 1 mm de longitud.

MC: Callo amarillo, formación de brotes incoloros de 0.1 a 1 mm de longitud.

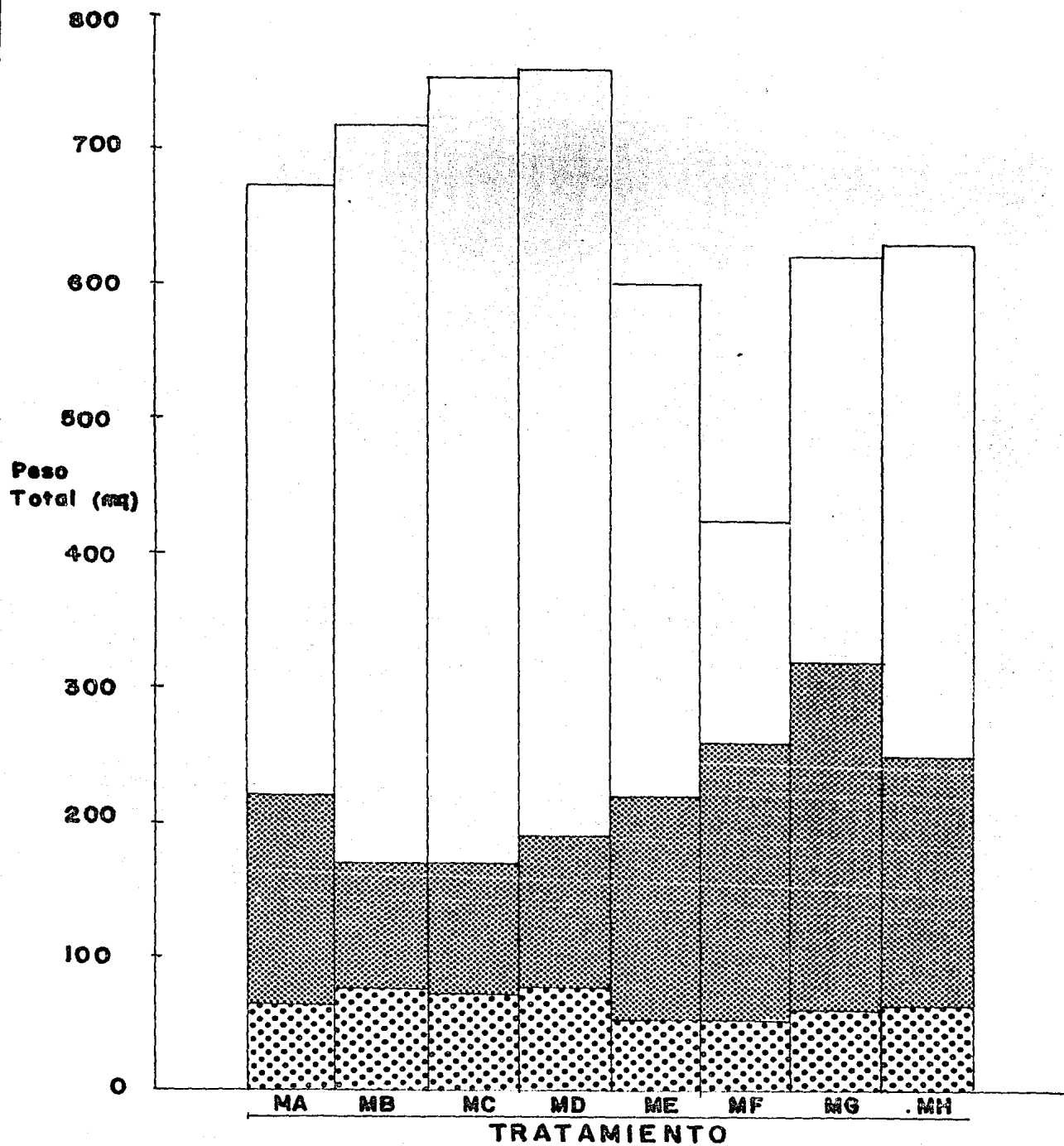
MD: Callo amarillo, formación de brotes incoloros de 0.1 a 1 mm de longitud.

ME: Callo amarillo, formación de brotes incoloros de 0.1 a 0.5 mm de longitud.

MF: Callo amarillo, formación de brotes incoloros de 0.1 a 1 mm de longitud.

MG: Callo amarillo.

MH: Callo amarillo.



**FIGURA 12.** Peso (mg) obteniendo en los distintos tratamientos de mantenimiento de callos a 22 días

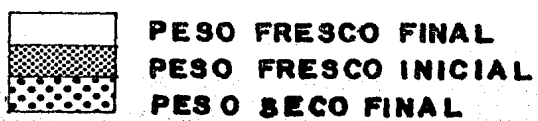


Tabla 4. Peso fresco y seco (mg) obtenido a 22 días de mantenimiento en los distintos medios.

Frasco	PFI	PPF	DPF	PSF
MA1	020	121	101	008
MA2	090	196	106	016
MA3	060	125	065	014
MA4	040	083	043	011
MA5	010	148	138	017
MB1	030	180	150	018
MB2	030	160	130	017
MB3	060	156	096	015
MB4	040	127	087	015
MB5	010	095	085	010
MC1	030	245	215	021
MC2	040	253	213	023
MC3	020	065	045	007
MC4	030	089	059	011
MC5	050	103	053	011
MD1	040	100	060	011
MD2	030	052	022	007
MD3	030	156	126	016
MD4	030	126	096	013
MD5	060	326	266	030
ME1	030	098	068	009
ME2	040	127	087	010
ME3	030	074	044	009
ME4	030	157	127	015
ME5	090	143	053	014
MF1	040	135	095	014
MF2	050	089	039	013
MF3	060	053	000	006
MF4	080	078	000	009
MF5	030	070	040	009



Frasco	PFI	PFF	DPF	PSF
MG1	060	095	035	006
MG2	040	090	050	009
MG3	130	198	068	019
MG4	030	127	097	014
MG5	060	109	049	014
MH1	040	116	076	013
MH2	060	045	000	007
MH3	060	136	076	014
MH4	020	214	194	017
MH5	070	120	050	013

Clave: PFI: Peso fresco inicial (día 0).  
PFF: Peso fresco final (día 22).  
DPF: Incremento en peso fresco del día 0 al 22.  
PSF: Peso seco final.

MA:  $\Sigma$  PFI = 220  
 $\Sigma$  PFF = 673  
 $\Sigma$  DPF = 453  
 $\Sigma$  PSF = 066  
 $\bar{PFI}$  = 044  
 $\bar{PFF}$  = 135  
 $\bar{DPF}$  = 091  
 $\bar{PSF}$  = 013

MB:  $\Sigma$  PFI = 170  
 $\Sigma$  PFF = 718  
 $\Sigma$  DPF = 548  
 $\Sigma$  PSF = 075  
 $\bar{PFI}$  = 034  
 $\bar{PFF}$  = 144  
 $\bar{DPF}$  = 110  
 $\bar{PSF}$  = 015

MC:  $\Sigma$  PFI = 170  
 $\Sigma$  PFF = 755  
 $\Sigma$  DPF = 585  
 $\Sigma$  PSF = 073  
 $\bar{PFI}$  = 034  
 $\bar{PFF}$  = 151  
 $\bar{DPF}$  = 117  
 $\bar{PSF}$  = 015

MD:  $\Sigma$  PFI = 190  
 $\Sigma$  PFF = 760  
 $\Sigma$  DPF = 570  
 $\Sigma$  PSF = 077  
 $\bar{PFI}$  = 064  
 $\bar{PFF}$  = 124  
 $\bar{DPF}$  = 114  
 $\bar{PSF}$  = 015

ME:  $\Sigma$  PFI = 220  
 $\Sigma$  PFF = 599  
 $\Sigma$  DPF = 379  
 $\Sigma$  PSF = 051  
 $\bar{PFI}$  = 044  
 $\bar{PFF}$  = 120  
 $\bar{DPF}$  = 076  
 $\bar{PSF}$  = 013

MF:  $\Sigma$  PFI = 260  
 $\Sigma$  PFF = 425  
 $\Sigma$  DPF = 174  
 $\Sigma$  PSF = 051  
 $\bar{PFI}$  = 052  
 $\bar{PFF}$  = 085  
 $\bar{DPF}$  = 035  
 $\bar{PSF}$  = 010

MG: $\Sigma$ PFI = 320	MH: $\Sigma$ PFI = 250
$\Sigma$ PFF = 619	$\Sigma$ PFF = 631
$\Sigma$ DPF = 299	$\Sigma$ DPF = 396
$\Sigma$ PSF = 062	$\Sigma$ PSF = 064
$\overline{\text{PFI}}$ = 064	$\overline{\text{PFI}}$ = 050
$\overline{\text{PFF}}$ = 124	$\overline{\text{PFF}}$ = 126
$\overline{\text{DPF}}$ = 060	$\overline{\text{DPF}}$ = 079
$\overline{\text{PSF}}$ = 012	$\overline{\text{PSF}}$ = 013

Tabla 5. Asignación de rangos para la prueba de Kruskal-Wallis basada en las diferencias de peso fresco de 0 a 22 días (DPF = PFF - PFI).

	MA	MB	MC	MD	ME
	08.0	23.0	10.0	04.0	09.0
	18.0	24.5	14.5	17.0	14.5
	30.0	27.5	16.0	27.5	19.5
	31.0	34.0	38.0	32.0	24.5
	35.0	36.0	39.0	40.0	33.0
Rj =	122.0	145.0	117.5	120.5	100.5
	MF	MG	MH		
	02.0	05.0	02.0		
	02.0	11.0	12.5		
	06.0	12.5	21.5		
	07.0	19.5	21.5		
	26.0	29.0	37.0		
Rj =	43.0	77.0	94.5		

Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis (Apéndice E):

$$H = 10.22647$$

$$H' = 10.23607$$

H (tablas) a probabilidad ( $\alpha = 0.05$ ) = 14.067, por lo que se acepta que con esa probabilidad no existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados.

Observaciones microscópicas. Se encuentran básicamente los mismos tipos celulares que los observados en la fase de inducción, con algunas diferencias en el arreglo de las células protraqueales que ahora se encuentran dispersas por todo el callo y no en bloques compactos. Los brotes incoloros de las orillas están formados por células gigantes del mismo tipo de las encontradas en la inducción pero con un tamaño considerablemente mayor.

## V. Resultados.

3. Fase D. Extracto de F. oxysporum en cultivo de callo.

Tabla 6. Peso fresco (mg) obtenido a los 22 días.

Frasco				Frasco			
EE	PFI	PFF	DPF	EF	PFI	PFF	DPF
D1	140	223	083	E1	120	127	007
D2	030	057	027	E2	060	062	002
D3	080	082	002	E3	060	067	007
D4	060	096	036	E4	040	056	016
D5	040	075	035	E5	080	080	000
D6	130	242	112	E6	030	030	000
D7	060	123	063	E7	100	100	000
D8	070	071	001	E8	090	093	003
D9	070	079	009	E9	030	057	027
D10	070	118	048	E10	060	068	008
D11	080	155	075	E11	070	073	003
D12	050	109	059	E12	100	117	017

Clave: PFI: Peso fresco inicial.

PFF: Peso fresco final.

DPF: Incremento en el peso fresco de 0 a 22 días.

$$\begin{aligned}
 \text{EE: } \sum \text{PFI} &= 880 \\
 \sum \text{PFF} &= 1430 \\
 \sum \text{DPF} &= 550 \\
 \overline{\text{PFI}} &= 73.3 \\
 \overline{\text{PFF}} &= 119.2 \\
 \overline{\text{DPF}} &= 45.8
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{EF: } \sum \text{PFI} &= 840 \\
 \sum \text{PFF} &= 930 \\
 \sum \text{DPF} &= 90 \\
 \overline{\text{PFI}} &= 70 \\
 \overline{\text{PFF}} &= 77.5 \\
 \overline{\text{DPF}} &= 7.5
 \end{aligned}$$

Tabla 7. Tabla para la suma de rangos de Wilcoxon, basada en los incrementos en peso fresco a los 22 días ( veáse apéndice F).

Par	EE	EF	DIF	RANGO
1	083	007	+076	+11
2	027	002	+025	+05
3	002	007	-005	-02
4	036	016	+020	+04
5	035	000	+035	+06
6	112	000	+112	+12
7	063	000	+063	+09
8	001	003	-002	-01
9	009	027	-018	-03
10	048	008	+040	+07
11	075	003	+072	+10
12	059	017	+042	+08

Suma de rangos positivos: 72

Suma absoluta de rangos negativos: 06

$T_s = 06, n = 12$

$\alpha = 0.0046$  para  $T_s = 7$ , por lo tanto hay diferencias significativas en los dos tratamientos con una probabilidad del 99%.

## VI. Discusión y conclusiones.

La utilización de los medios MS y BDS muestran claramente la existencia de diferencias en cuanto a la velocidad, porcentaje y cantidad de callo formado y su estrecha relación con las combinaciones hormonales empleadas.

El medio BDS presenta, en cuanto a los macroelementos, reducción en las concentraciones de nitrato, amonio y calcio y aumento en la cantidad de fosfato y potasio con respecto al MS, y en cuanto a los microelementos en el BDS se presenta un aumento de 100 veces en la concentración de la tiamina, aunque el efecto de estas diferencias parece no ser determinante sin la conjunción de las concentraciones hormonales, en donde se observa que la adición de 2,4-D, AIA y K (1 mg/l) resulta ser mejor en el medio BDS pero no así en el medio MS en donde resulta más adecuada la concentración del 2,4-D (1 mg/l) y el AIA y la K (2 mg/l).

La causa de este fenómeno no tiene una explicación aún clara, pero abre una gran interrogante en cuanto a las relaciones reguladores-medios de cultivo.

Si bien los resultados en cuanto a la velocidad y porcentaje de inducción de callo son meramente estimativos (dado que no existe un criterio único para denominar a un tejido como callo), las pruebas basadas en el peso fresco obtenido permiten establecer decisiones estadísticas en cuanto a la cantidad de material

observablemente indiferenciado. Para ésto la prueba de rangos múltiples de Kruskal-Wallis y la comparación múltiple subsecuente resultan las pruebas más demostrativas.

En las observaciones microscópicas, sin embargo, observamos la presencia de células indiferenciadas y diferenciadas que además de impedir, estas últimas, el buen establecimiento de los cultivos celulares hacen cuestionar la presencia de este tejido como un callo verdadero. Pero a pesar de ello, es este material el de mejor calidad obtenida en el transcurso de los años y que si bien nos limita para algunas investigaciones, si nos permite realizar otras.

Se recomienda pues, con la aclaración hecha, como el mejor medio de trabajo para la inducción de callo de Allium sativum ; BDS + 2,4-D (1 mg/l) + AIA (1 mg/l) + K (1 mg/l).

Ahora bien, es posible extender esta recomendación a la fase de mantenimiento, en la cual no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de peso fresco obtenido para las distintas combinaciones hormonales pero si se observaron características de organogénesis en la formación de brotes incoloros en todos los medios en donde el 2,4-D esta ausente o en concentración menor a 1 mg/l, independientemente de las concentraciones de AIA y K, por lo que es recomendable no eliminar el 2,4-D en el mantenimiento.

Con respecto al efecto causado por el extracto de Fusarium

oxysporum en cuanto a la reducción o inactivación del crecimiento en callo (efectos que son demostrados estadísticamente con la Prueba de Wilcoxon) podemos decir que la extracción resulta ser adecuada, pues no se degrada la toxina involucrada y el efecto causado a nivel de cultivo semisólido hace posible su uso como modelo para estudios de selección.

Es necesario continuar con los estudios en este campo. A corto plazo es indispensable conocer aspectos como: la fitotoxina involucrada en el proceso, los cambios cariológicos y de metabolitos secundarios causados, la técnica de selección in vitro y los mecanismos de propagación (organogénesis y embriogénesis).



## VII. Bibliografía.

- Abo El-Nil, M.M. (1977). Organogenesis and Embryogenesis in Callus Cultures of Garlic (Allium sativum L.). Plant Sci. Letters, 9: 259-264.
- Arias, J.A. (1985). Secretory Organelle and Mitochondrial Alterations Induced by Fusaric Acid in Root Cells of Zea mays. Physiol. Plant Pathol., 27: 149-158.
- Behnke, M. (1979). Selection of Potato Callus Resistant to Culture Filtrates of Phytophthora infestans and Regenerating Resistant Plants. Theor. Appl. Genet., 55: 69-71.
- \_\_\_\_\_. (1980). Selection of Dihaploid Potato Callus for Resistance to the Culture Filtrate of Fusarium oxysporum. Z. Pflanzenzucht, 85: 244-258.
- Bhojwani, S.S. (1980). In vitro Propagation of Garlic by Shoot Proliferation. Sci. Hort., 13: 47-52.
- \_\_\_\_\_, Cohen, D. & P.R. Fry (1982). Production of Virus-Free Garlic and Field Performance of Micropropagated Plants. Sci. Hort., 18: 39-43.

Conci, V.C., Moriconi, D.N. y S.F. Nome (1985). Cultivo de Meristemas Apicales de Diferentes Tipos Clonales de Ajo (Allium sativum L.) (Comunicación Personal).

Cortada de Kohan, N. y J.M. Carro (1972). Estadística Aplicada, 5a edición, Ed. Universitaria de Buenos Aires, Argentina. 368 p.

D.G.E.A. (1982). Programa de Siembra-Exportación de Ajo, Temporada 1982-1983, S.A.R.H., México. 24 p.

Dolezel, J. & F.J. Novak (1984). Cytogenetic Effect of Plant Tissue Culture Medium with Certain Growth Substances on Allium sativum L. Meristem Root Tip Cells. Biol. Plant., 26(4): 293-298.

\_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. (1985). Karyological and Cytophotometric Study of Callus Induction in Allium sativum L., J. Plant Physiol., 118: 421-429.

Dunstan, D.I. & K.C. Short (1977). Improved Growth of Tissue Culture of the Onion, Allium cepa. Physiol. Plant., 41: 70-72.

- Earle, E.D. (1978). Phytotoxin Studies with Plant Cells and Proto-  
plasts. In: Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978.  
Thorpe, T.A. (Ed.), Calgary, Canada. pp. 363-372.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & K. Ojima (1968). Nutrient Require-  
ments of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. Exp.  
Cell Res., 50: 151-158.
- García, S.F. (1973). Observaciones sobre el Cultivo de Ajo. Depar-  
tamento de Divulgación Agrícola, Ministerio de Agrícultu-  
ra, Guatemala. 48 p.
- Garza, Q.A. (1972). Prueba Comparativa de Adaptación y Rendimiento  
de 7 Variedades de Ajo (Allium sativum L.) en el Municipi-  
pio de General Terán, N.L., Invierno de 1970. Tesis Pro-  
fesional, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León,  
México.
- González, M.J.A. (1978). Diferentes Niveles de Fertilización y  
Epocas de Aplicación en el Cultivo de Ajo (Allium  
sativum L.) en la Región Central del Bajío, Tesis Profe-  
sional, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León,  
México.

- Hammerschlag, F.A. (1984). In Vitro Approaches to Disease Resistance. In: Applications of Genetic Engineering to Crop Improvement. Collins, G.B. & J.G. Petrolino (Eds.). Martinus Nijhoff/D.W. Junk Pub., Dordrecht. pp 453-490.
- Havranek, P. & F.J. Novak (1973). The Bud Formation in the Callus Cultures of Allium sativum L.. Z. Pflanzenphysiol., 68: 308-318.
- Hernández, D.J.E. (1980). Diseño de una Planta Industrial para la Deshidratación de Ajo y Cebolla. Tesis Profesional, Instituto Politécnico Nacional, México.
- Hollander, M. & D.A. Wolfe (1973). Nonparametric Statistical Methods. John Wiley & Sons, New York. 503 p.
- I.M.C.E. (1974). Cebolla y Ajos Deshidratados, Análisis de Mercado, México. 16 p.
- \_\_\_\_\_. (1979a). El Ajo Fresco en Francia. Análisis de Mercado, México. 16 p.
- \_\_\_\_\_. (1979b). El Ajo Deshidratado en Italia, Análisis de Mercado, México. 16 p.

- Japón, Q.J. (1984). El Cultivo de Ajo. Publicaciones de Extensión Agraria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, Madrid. 16 p.
- Kehr, A.E. & G.W. Schaeffer (1976). Tissue Culture and Differentiation of Garlic. Hort. Sci., 11(4): 422-423.
- Lawrence, G.H.M. (1951). Taxonomy of Vascular Plants. Macmillan Pub. Co. Inc., New York. 823 p.
- López, L.F. (1978). El Cultivo del Ajo en el Valle de Culiacán. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, S.A.R.H., México. 24 p.
- Morell, D. (1977). Hay Dinero y Salud en el Ajo. Ed. Sintés, Barcelona. 148 p.
- Mosella, C. y R. Fernández (1985). II. Cultivo In Vitro del Ajo (Allium sativum L.) Tipo Rosado. Simiente, 55 (1-2): 60-63.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.

- Nome, S.F., Abril, A. y R. Racca (1981). Obtención de Plantas de Ajo (Allium sativum L.) Libres de Virus mediante el Cultivo de Meristemas Apicales. Phyton, 41 (1/2): 139-151.
- Novak, F.J. (1972). Tapetal Development in the Anthers of Allium sativum L. and Allium longicuspis Regel. Experientia, 28: 1380-1381.
- \_\_\_\_\_. (1974). The Changes of Karyotype in Callus Culture of Allium sativum L., Caryologia, 27(1): 45-54.
- \_\_\_\_\_. (1980). Phenotype and Cytological Status of Plant Regenerated from Callus Cultures of Allium sativum L., Z. Pflanzenzucht, 84: 250-260.
- \_\_\_\_\_. (1981). Chromosomal Characteristics of Long-Term Callus Cultures of Allium sativum L., Cytologia, 46: 371-379.
- \_\_\_\_\_. (1983). Production of Garlic (Allium sativum L.) Tetraploids in Shoot-Tip In Vitro Culture. Z. Pflanzenzucht, 91: 329-333.

\_\_\_\_\_, Havel, L. & J. Dolezel (1982). In Vitro Breeding System of Allium. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara, A. (Ed.). Tokyo, pp. 767-768.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ (1985). Onion, Garlic and Leek (Allium species). In: Biotechnology of Plant Improvement, Bajaj (Ed.), Springer-Verlag, Berlin; pp. 387-404.

Obeso, S.D. (1980). Análisis Económico de 7 Densidades de Siembra de Ajo (Allium sativum L.) en Apodaca, N.L., Tesis Profesional, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Nuevo León, México.

Quiot, J. Messiaen, C., Marrou, J. et J. Leroux (1972). Regeneration par Culture de Meristememes de Clones D'Ail Infectes de Façon Chronique par le Virus de la Mosaïque de L'Ail. Actas III Cong. Union Fitopatol. Mediterr., Oeiras, Outubro 1972. pp. 429-433.

Sánchez, S.O. (1980). La Flora del Valle de México. Ed. Herre-  
ro, México. 518 p.

Sokal, R.R. & F.J. Rohlf (1973). Introduction to Biostatistics.  
W.H. Freeman & Co., San Francisco. 368 p.

Soriano, G.J. (1977). Aislamiento de Protoplastos a partir de Tejidos de Jitomate. Tesis Profesional, Fac. de Química, U.N.A.M., México.

Walton, J.D. & E.D. Earle (1984). Isolation and Bioassay of Fungal Phytotoxins. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. I. Vasil, I.K. & V. Vasil (Eds.), Academic Press, New York. pp. 598-607.

Zavala, V.J.T. (1984). Control Químico de Ditylenchus dipsaci (Kuhn) Filipjev (Nematoda: Tylenchidae) en Ajo (Allium sativum L.) en Tetela de Ocampo, Pue., Tesis Profesional, Universidad Autónoma de Chapingo, México, México.



## APENDICE A.

TABLA 1. Producción Nacional de Ajo.

Año	Superficie (Ha)	Rendimiento (T/Ha)	Producción (T)
1925 <sup>1</sup>	830	3.76	3128
1930 <sup>1</sup>	1031	3.40	3510
1940 <sup>1</sup>	2504	2.31	5797
1970 <sup>2</sup>	6585	4.40	28998
1977 <sup>3</sup>	7213	4.36	35049
1978 <sup>3</sup>	7722	6.17	47632
1979 <sup>3</sup>	8933	6.72	59987
1980 <sup>3</sup>	6196	7.63	46750
1981 <sup>3</sup>	5358	7.45	39916
1982 <sup>3,4</sup>	3988	8.44	33677

1. Fuente: Dirección de Economía Rural, S.A.F., 1941.

2. Fuente: Zavala, 1984.

3. Fuente: Dirección General de Economía Agrícola, S.A.R.H., 1982.

4. Estimado.

TABLA 2. Producción de ajo por estado (1982).

Estado	Sup (Ha)	Rend (T/Ha)	Prod (T)
Aguascalientes	785	9.60	7535
Guanajuato	650	8.99	5843
Puebla	617	9.33	5758
Queretaro	557	8.24	4589
Zacatecas	525	6.84	3592
B.C.N.	285	8.00	2280
S.L.P.	235	6.96	1635
Otros	334	7.32	2446

Fuente: Dirección General de Economía Agrícola, S.A.R.H., 1982.

## APENDICE B.

Composición de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962) y BDS (Dunstan y Short, 1977).

Reactivo	Concentración (mg/l)	
	MS	BDS
Nitrato de potasio ( $KNO_3$ )	1900.00	2530.00
Nitrato de amonio ( $NH_4NO_3$ )	1650.00	320.16
Sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	27.80	27.80
Sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	370.00	247.00
Sulfato de amonio ( $(NH_4)_2SO_4$ )	-	134.00
Fosfato monobásico de sodio ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ )	-	172.00
Fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ )	170.00	-
Fosfato de Amonio ( $NH_4H_2PO_4$ )	-	230.06
Cloruro de calcio ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ )	440.00	150.00
EDTA. $Na_2$	37.30	37.25
Sulfato manganoso ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ )	22.30	13.20
Sulfato de zinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ )	8.60	2.00
Sulfato cuproso ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	0.03	0.04
Cloruro de cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.03	0.04
Yoduro de potasio (KI)	0.83	0.75
Molibdato de sodio ( $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.25	0.25
Acido bórico ( $H_3BO_3$ )	6.20	3.00
Glicina	2.00	-
Tiamina.HCl	0.10	10.00
Piridoxina.HCl	0.50	1.00
Acido nicotínico	0.50	1.00
m-inositol	100.00	100.00
Sacarosa	30000.00	30000.00

## APENDICE C.

Modo de preparación del medio MS (Murashige y Skoog, 1962),  
basado en Soriano, 1977.

## Solución 1.

Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	16.5 g
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	19.0 g
Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.7 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	3.7 g
H <sub>2</sub> O cbp	1000 ml

## Solución 2.

Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	11.0 g
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 3.

Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.695 g
EDTA. Na <sub>2</sub>	0.9325 g
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 4.

Acido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0.155 g
Sulfato manganoso ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.5575 g
Yoduro de potasio (KI)	20.75 mg
Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	0.215 g
Stock A	2.5 ml
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 5.

Glicina	20.0 mg
m-inositol	1.0 g
Acido nicotínico	5.0 mg
Piridoxina.HCl	5.0 mg
Tiamina.HCl	1.0 mg
H <sub>2</sub> O cbp	100 ml

## Stock A.

Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.5 g
Sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	50.0 mg
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	50.0 mg
H <sub>2</sub> O cbp	200 ml

Medio de cultivo:	Solución 1:	100 ml
	Solución 2:	10 ml
	Solución 3:	10 ml
	Solución 4:	10 ml
	Solución 5:	10 ml
	Sacarosa	30 g
	H <sub>2</sub> O cbp	1000 ml

## APENDICE D.

Modo de preparación del medio BDS (Dunstan y Short, 1977).

## Solución 1.

Sulfato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1.34 g
Nitrato de amonio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	3.20 g
Nitrato de potasio (KNO <sub>3</sub> )	25.30 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	2.47 g
H <sub>2</sub> O cbp	1000 ml

## Solución 2.

Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	3.75 g
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 3.

Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.9201 g
EDTA.Na <sub>2</sub>	0.9312 g
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 4.

Fosfato de amonio (NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5.75 g
Fosfato monobásico de sodio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	4.30 g
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 5.

Acido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	75.0 mg
Sulfato manganoso (MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)	0.33 g
Sulfato de zinc (ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	50.0 mg
Yoduro de potasio (KI)	18.0 mg
Stock B	2.5 ml
H <sub>2</sub> O cbp	250 ml

## Solución 6.

Tiamina.HCl	0.1 g
m-inositol	1.0 g
Piridoxina.HCl	10.0 mg
Acido nicotínico	10.0 mg
H <sub>2</sub> O cbp	100 ml

## Stock B.

Molibdato de sodio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0.5 g
Sulfato cúprico (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	80.0 mg
Cloruro de cobalto (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	60.0 mg
H <sub>2</sub> O cbp	200 ml

Medio de cultivo:	Solución 1:	100 ml
	Solución 2:	10 ml
	Solución 3:	10 ml
	Solución 4:	10 ml
	Solución 5:	10 ml
	Solución 6:	10 ml
	Sacarosa	30 g
	H <sub>2</sub> O cbp	1000 ml

APENDICE E.

Prueba de rangos múltiples de Kruskal-Wallis (Cortada de Kohan y Carro, 1972; Hollander y Wolfe, 1973).

Para determinar la existencia de asociación entre una variable medida con escala nominal y otra variable medida con escala ordinal, vamos a utilizar la prueba denominada de Kruskal-Wallis. Esta prueba no se realiza sobre la frecuencia de las observaciones, sino sobre los valores o categorías de las mismas. Su objeto reside en calcular un estadístico H, que en el modelo teórico se distribuye como la función de densidad de  $\chi^2$  con  $k-1$  grados de libertad. La prueba puede realizarse siempre que a cada categoría de la escala nominal le correspondan, por lo menos, cinco valores de la escala ordinal. El número de grados de libertad está dado por el número de categorías de la escala nominal (K) menos 1.

El estadístico H está dado por:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \left( \sum \frac{R_j^2}{n_j} \right) - 3(N+1) \quad (1)$$

Donde:

H = Valor que se distribuye como  $\chi^2$  con  $k-1$  grados de libertad igual a  $k-1$ , en el caso del modelo estocástico teórico.

N = Cantidad total de observaciones =  $\sum n_j$ .

$R_j$  = Suma de los valores teóricos de los rangos de la categoría  $j$ .

$n_j$  = Cantidad de observaciones de cada categoría  $j$ .

$K$  = Número de categorías de la escala nominal.

El cálculo de  $H$  se modifica en el caso de datos ligados (observaciones empatadas), pues el valor de  $H$  dado por la fórmula (1) se corrige;

$$H' \text{ (H corregida)} = \frac{H}{1-D} \quad (2)$$

Donde;  $D = \frac{\sum T}{N^3 - N}$        $T = t^3 - t$

$t$  = número de datos ligados en un mismo orden.

La prueba plantea que;

$$H_0 : T_1 = \dots T_K$$

$H_a$  : No todos los tratamientos son iguales.

El procedimiento es el siguiente;

1. Se asignarán rangos a las  $N$  observaciones obtenidas de menor a mayor. Para datos ligados se estableciera el valor intermedio de los rangos correspondientes, Así  $r_{ij}$  denota el rango de  $X_{ij}$ .

2. Teniendo que  $j = 1, \dots, K$

$$R_j = \sum r_{ij}$$

Así, por ejemplo,  $R_1$  es la suma de rangos recibidos en el tratamiento 1.



3. Se despejará la fórmula (1).

4. Si existiesen datos ligados se despejará  $H'$  con la fórmula (2).

5. A nivel de significancia  $\alpha$  y  $n > 5$ ,

Rechace  $H_0$  si  $H > \text{Probabilidad de } \chi^2$  a g.l. =  $K-1$

Acepte  $H_0$  si  $H < \text{Probabilidad de } \chi^2$  a g.l. =  $K-1$

Si  $H$  Probabilidad de  $\chi^2$  a g.l. =  $K-1$ , podemos determinar las diferencias entre cada tratamiento en base a la comparación múltiple de los valores  $R_j$  mediante el siguiente procedimiento:

1. Determine el número de comparaciones (N.C.);

$$N.C. = \frac{K(K-1)}{2}$$

2. Teniendo que;

$$T_u \neq T_v \quad \text{sí: } |R_u - R_v| \geq q(\alpha, K, n) \left[ \frac{K(Kn-1)}{2} \right]$$

Donde:  $T_u$  y  $T_v$  = tratamientos comparados.

$R_u$  y  $R_v$  =  $\Sigma$  rangos de los tratamientos comparados.

$\alpha$  = nivel de significancia.

3. Establezca  $|R_u - R_v|$  para cada comparación y las diferencias entre ellas a partir del valor de  $q(\alpha, K, n)$  que se obtiene de la tabla de valores críticos seleccionados para rangos de  $K$ .

Cuando  $n < 5$  debe consultarse tabla especial para valores de Kruskal-Wallis (Hollander y Wolfe, 1973).

## APENDICE F.

Prueba de Wilcoxon para dos muestras (Sokal y Rohlf, 1973).

Cuando en estadística no paramétrica se requiere trabajar o comparar únicamente dos tratamientos o muestras es común recurrir a la prueba de Wilcoxon, que establece;

Ho: Las dos muestras ( $n_1$  y  $n_2$ ) provienen de una población que tiene la misma distribución.

Ha:  $n_1$  y  $n_2$  tienen diferente distribución.

La prueba utilizada para igual número de observaciones por tratamiento consiste en calcular un estadístico  $T_s$  bajo el siguiente procedimiento:

1. Ordene los datos de uno y otro tratamiento por pares.
2. Compute las diferencias entre los  $n$  pares de observaciones y denomínese como  $D$ .
3. Asigne rangos a estas diferencias de menor a mayor sin importar el signo.
4. Asigne a los rangos el signo original de las diferencias.
5. Sume los rangos positivos y negativos separadamente. La suma menor en valor absoluto,  $T_s$ , compárese con los valores críticos para la suma de valores de Wilcoxon.
6. Establezca nivel de confianza.