



Empleo de técnicas biotecnológicas en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.)

Use of biotechnological techniques in garlic crop (*Allium sativum* L.)

 Marian Rodríguez Hernández*

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

RESUMEN: La biotecnología vegetal se ha convertido en una estrategia viable para la agricultura, sus aplicaciones contemplan estrategias dirigidas a la obtención y mantenimiento de cultivares libres de patógenos, mejoramiento genético (cultivo de anteras, rescate de embriones, etc) y la micropropagación, empleada para obtener un mayor número de individuos en menor tiempo y espacios reducidos. Cada una de sus fases depende, en gran medida, de un medio de cultivo adecuado, pues el crecimiento, desarrollo y la morfogénesis del explante se debe, principalmente, a la composición química del mismo. Para la producción de “semilla” de ajo (*Allium sativum* L.) de alta calidad, todas las fases se llevan a cabo en una cámara de crecimiento en condiciones asépticas y artificiales controladas automáticamente y a una temperatura que oscila entre 22-25 °C. La embriogénesis somática, permite regenerar plantas completas a partir de una célula. El ajo es una planta anual que solo se reproduce de forma asexual, por ello, lo afectan bacterias, hongos y, fundamentalmente, virus, que contribuyen a la disminución de su rendimiento entre 50-80 %. Una alternativa para evitar estos problemas, es el empleo de la quimioterapia, termoterapia o el empleo combinado de una de esas técnicas con el cultivo de meristemas, para obtener plantas de elevada calidad biológica. Según el comportamiento del cultivo durante su etapa *in vitro* será su respuesta en la fase de aclimatización y, posteriormente, en condiciones de campo. Este trabajo se realizó con el objetivo de profundizar en el conocimiento de algunas técnicas biotecnológicas que se aplican en el cultivo del ajo

Palabras clave: Ajo, carga viral, cultivo *in vitro*, micropropagación, plantas libres de virus.

ABSTRACT: Plant biotechnology has become a viable strategy for agriculture, its applications include strategies aimed at obtaining and maintaining pathogen-free cultivars, genetic improvement (anther cultivation, embryo rescue, etc.) and micropropagation, used to obtain a greater number of individuals in less time and reduced spaces. Each of its phases depends largely on an adequate culture medium, since the growth, development and morphogenesis of the explant is mainly due to its chemical composition. For the production of garlic "seed" (*Allium sativum* L.), all phases are carried out in a growth chamber under automatically controlled aseptic and artificial conditions and at a temperature ranging between 22-25 °C. Somatic embryogenesis allows complete plants to be regenerated from a single cell. Garlic is an annual plant that only reproduces asexually, which is why bacteria, fungi and mainly viruses, which contribute to a 50-80 % decrease in its yield, affect it. An alternative to avoid these problems is the use of chemotherapy, thermotherapy or the combined use of one of these techniques with the cultivation of meristems, to obtain plants of high biological quality. Depending on the behavior of the culture during its *in vitro* stage, its response will be in the acclimatization phase and later in field conditions. This work was carried out with the objective of deepening the knowledge of some biotechnological techniques that are applied in the cultivation of garlic.

Key words: Garlic, viral load, *in vitro* culture, micropropagation, virus-free plants.

*Autor para correspondencia: marian@inca.edu.cu

Recibido: 15/09/2022

Aceptado: 18/11/2022

Conflicto de intereses: No existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Conceptualización, investigación, metodología, supervisión: escritura del borrador inicial y edición final, curación de datos: Marian Rodríguez Hernández.

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la biotecnología vegetal se ha convertido en una estrategia viable para la agricultura, gracias a sus grandes avances, los cuales comprenden el uso de nuevas tecnologías generadas por el conocimiento de la Genética y la Biología Molecular, que son las técnicas relacionadas con el cultivo *in vitro* de órganos inmaduros, la manipulación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) recombinante y los marcadores genéticos moleculares. Una de sus ramas es el cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos, que no es más, que explotar la capacidad que tienen las células vegetales, protoplastos u órganos para regenerar una planta completa, que es a lo que se le denomina totipotencia o totipotencialidad celular, concepto expuesto por Haberlandt (1). El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta anual, que en nuestro país solo se reproduce de forma asexual debido, entre otros factores, a las condiciones climáticas (2). Además, no produce "semillas" viables, por lo que se plantan "semillas" provenientes de los bulbos cosechados en la temporada anterior (3).

En estas condiciones de siembra, las enfermedades fitopatógenas se transmiten más fácilmente a la descendencia, lo que provoca un debilitamiento progresivo e irreversible de las variedades o clones. Son varios los problemas fitosanitarios involucrados capaces de causar pérdidas del 50 % o más del rendimiento, ya sea por la presencia de nemátodos, enfermedades fungosas, bacterianas y virales, que son las que más influyen en el deterioro del cultivo (2,4). Una de las medidas de combate más eficientes es el empleo de "semilla" libre de virus mediante el cultivo de tejidos o meristemos (5).

El éxito del cultivo de tejidos depende, en gran medida, del medio de cultivo o medio nutritivo adecuado para cada una de las etapas de la micropropagación *in vitro*, así como para el crecimiento, desarrollo y la morfogénesis del explante (6).

Para la producción de "semilla" de ajo, todas las fases de micropropagación se llevan a cabo en la cámara de crecimiento que, por lo general, se encuentra en el laboratorio en condiciones asépticas y artificiales controladas automáticamente, para permitir el desarrollo de las plántulas *in vitro*. La temperatura óptima para su desarrollo oscila entre 22-25 °C (7).

A su vez, la embriogénesis somática, permite regenerar plantas completas, y es ampliamente usada por la biotecnología y en estudios sobre embriología; su principal ventaja es la producción de numerosas plántulas a partir de una célula y permite la evaluación y mejoramiento genético. En estas técnicas, la regeneración dependerá del tipo de explante, concentración, combinación de reguladores del crecimiento y nutrientes (8).

En la actualidad existen numerosas técnicas que se emplean para detectar la posible variabilidad genética en las plántulas cultivadas *in vitro*. En los estudios morfológicos, los caracteres deben ser descubiertos y delimitados generalmente sin ningún criterio explícito para la selección o la codificación del carácter, por lo que tienen

el potencial de ser arbitrarios. Los morfólogos no divulgan generalmente sus criterios para incluir o excluir caracteres y cuando se dan los criterios, varían considerablemente entre estudios. Sin embargo, tienen la ventaja de permitir un muestreo taxonómico mucho más cuidadoso que el que se realiza con análisis moleculares, lo que es importante para las revisiones sistemáticas, los estudios de la evolución del carácter y la valoración filogenética (9).

En las técnicas citogenéticas, como las llamadas FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia) y GISH (hibridación *in situ* del genoma), se emplean tintes para marcar regiones diferentes de ADN. Ambas técnicas se utilizan para identificar cromosomas extraños o para detectar traslocaciones (cambios de posición de partes del cromosoma) en híbridos, lo cual no es posible con las técnicas de citogenética clásica como la tinción o el bandeo (10).

Con el avance tecnológico, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se demostró dentro de un organismo la existencia de las isoenzimas, formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza, debido a un cambio de movilidad electroforética. Esta sensibilidad electroforética hizo que la técnica haya revolucionado los estudios de diversidad genética en diversas especies como: lechuga (*Lactuca sativa* L.), lenteja (*Lens culinaris* M.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (11).

En cuanto a las técnicas moleculares, el polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en el ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otras (12).

El presente trabajo tiene como objetivo profundizar en la documentación que se dispone sobre el conocimiento de algunas técnicas biotecnológicas que se aplican en el cultivo *in vitro* del ajo.

DESARROLLO

1. Medios de cultivo empleados en ajo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos (13). Básicamente, los medios de cultivo suministran:

- **Fuente de carbono:** la sacarosa, en concentraciones de 2 al 5 %, el azúcar es el más utilizado. En algunos medios se reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También, el myo-inositol (100 mg L^{-1}) suele ser incorporado a los medios y se logra un mejor crecimiento de los cultivos.
- **Nutrientes minerales:** los medios de cultivo deben suministrar macro y micronutrientes, que son esenciales para el crecimiento de las plántulas. En general, se destacan las concentraciones relativamente elevadas de nitrógeno (suministrado en forma de amonio y nitrato) y potasio. También, se puede utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA), lo que lo hace disponible en un amplio rango de pH.
- **Vitaminas:** de todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.
- **Reguladores del crecimiento:** en la mayoría de los casos, los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas [ANA (ácido naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), AIA (ácido indolacético), AIB (ácido 3-indolbutírico), NOA (Ácido naftoxiacético), Dicamba, Picloram] y/o citocininas [BA o 6-BAP (6-bencil amino-purina), KIN (kinetina), ZEA (zeatina), 2-iP (2-isopenteniladenina,) Thidiazurón]. Las giberelinas [especialmente GA_3 (ácido giberélico)] son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de los brotes. El ABA (ácido abscísico), se utiliza en algunos casos.
- **Agente gelificante** (en el caso de medios de cultivo semisólidos): el agar (entre 0,6-1 %) es el compuesto más utilizado. También, pueden emplearse: Agargel (0,40-0,60 %), Transfergel (2,0-2,60 %), Phytigel (0,25-0,40 %), agarosa (0,80-0,90 %) y Gelrite (0,10-0,20 %).
- **Otros compuestos:** muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios de cultivo. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar, como es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína. En algunos medios de cultivo se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico, y es frecuente el empleo de la L-glutamina y la caseína hidrolizada.

En estudios realizados sobre la bulbificación *in vitro* del ajo, se emplearon las sales minerales de Murashige y Skoog (MS), a las que se le adicionaron 2-iP ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), tiamina ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), ácido nicotínico ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), piridoxina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), inositol (100 mg L^{-1}) y 30 g L^{-1} de sacarosa. En el efecto de la concentración de 2-iP solo se detectó diferencias significativas para la variable diámetro ecuatorial, y se obtuvo el mayor valor con el tratamiento de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, con $10,93 \text{ mm}$. Con todos los reguladores de crecimiento, la bulbificación fue del 100 %,

y solo en el tratamiento con 2-iP hubo formación de bulbos múltiples y en el 2 % de los cultivos, se obtuvieron entre 2-3 microbulbos de 2-5 mm de diámetro (14).

Para el establecimiento de un protocolo *in vitro* del cultivo del ajo en Costa Rica, el medio de cultivo empleado fue el de sales de Murashige y Skoog (MS), el cual se complementó con $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA. Adicionalmente, se le agregó uno de los siguientes reguladores de crecimiento: 6-BAP, Kinetina o 2-iP (15).

Estudios realizados mediante el uso de dos medios de cultivo: MS y LS (Linsmaier y Skoog) suplementados con 6-BAP para la variable longitud de la plántula, transcurridos los 14 días del subcultivo se observó que, las plántulas *in vitro* del tratamiento control, que se corresponden al medio de cultivo MS enriquecido solamente con vitaminas, tuvieron el mayor crecimiento longitudinal, donde la media fue de $2,56 \text{ cm}$, seguido por las plántulas del tratamiento 2 (T2) donde se emplearon las sales basales del medio LS suplementado con 6-BAP y los explantes alcanzaron una altura de $2,28 \text{ cm}$. El análisis estadístico de dicha variable mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos (16).

2. Principales componentes químicos empleados para el establecimiento *in vitro* del ajo

Al estudiar los clones de ajo 'Criollo-3', 'Criollo-6', 'Criollo-9', 'Martínez' y 'Vietnamita' para la micropropagación del cultivo se obtuvo como resultado que, tanto el hipoclorito de calcio (5 %-20 minutos) como el hipoclorito de sodio (10 %-15 minutos, con 5 % de Cl_2 activo), fueron efectivos en la desinfección de los explantes, supervivencia y vigor de las plántulas; los explantes se establecieron mejor y en menor tiempo en un medio MS basal suplementado con ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y KIN ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Se obtuvo entre 4,9-7,3 brotes por explante, en dependencia del subcultivo y del clon, en el medio de cultivo anterior enriquecido con ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y 2-iP (4 mg L^{-1}). El mayor porcentaje de bulbificación *in vitro* se indujo en el medio basal antes citado cuando se le adicionaron 75 g L^{-1} de sacarosa. Los microbulbillos fueron superiores a las plántulas *in vitro*, ya que alcanzaron entre 95,35-99,40 % de supervivencia cuando se plantaron en bandejas de poliestireno expandido, en un sustrato compuesto por Zeolita [Litonita] (25%) y M.O [Cachaza descompuesta] (75%) (17).

Resultados obtenidos a partir de una metodología de desinfección para la implantación *in vitro* de explantes de ajo (18) mostraron que, la misma se comportó de forma desigual, ya que se observaron diferencias estadísticas entre las variantes de desinfección que se analizaron, en cuanto a la supervivencia de los explantes; los mejores resultados se alcanzaron en los tratamientos: 7 [Ca_2OCl (5 %-10 minutos)], 8 [Ca_2OCl (5 %-15 minutos)], 9 [Ca_2OCl (5 %-20 minutos)], 11 [NaOCl (10 %-10 minutos)], 12 [NaOCl (10 %-15 minutos)] y 13 [NaOCl (10 %-20 minutos)], todos con 90 % y superaron al control 1 [alcohol (70 %-30 minutos)] que alcanzó un 59,60 % de supervivencia.

El establecimiento de plántulas *in vitro* de clones de ajo peruano a partir de dos compuestos químicos mostró que, el tratamiento de los explantes con hipoclorito de calcio (1 %) e hipoclorito de sodio (0,1 %) durante 10 y 15 minutos, respectivamente, permitió una eliminación total de los microorganismos contaminantes de los clones peruanos 'P-007A' y 'P-007B' (19).

Como puede observarse, el empleo de compuestos químicos a concentraciones adecuadas es de suma importancia en la desinfección de explantes de ajo para su propagación *in vitro*, pues se reduce la contaminación de los mismos, así como también en el medio de cultivo empleado.

3. Empleo de técnicas biotecnológicas en el cultivo del ajo

Actualmente, se han desarrollado numerosas técnicas biotecnológicas, entre ellas el cultivo de tejidos y órganos, el rescate de embriones, la fusión de protoplastos, los marcadores moleculares, el establecimiento de la secuencia de las proteínas y ADN, y la ingeniería genética (20).

3.1. Principales virus que afectan el cultivo del ajo

A nivel mundial existen 15 virus asociados con el cultivo del ajo pertenecientes a cinco géneros diferentes (21). Estos incluyen:

- 8 Alexivirus: *Garlic virus-A* (GarV-A, virus A del ajo), *Garlic virus-B* (GarV-B, virus B del ajo), *Garlic virus-C* (GarV-C, virus C del ajo), *Garlic virus-D* (GarV-D, virus D del ajo), *Garlic virus-E* (GarV-E, virus E del ajo), *Garlic virus-X* (GarV-X, virus X del ajo), *Shallot virus X* (ShVX, virus X del shalote) y *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbFV, virus filamentoso del ajo transmitido por arañita).
- 3 Potyvirus: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV, virus del enanismo amarillo de la cebolla), *Leek yellow stripe virus* (LYSV, virus del rayado amarillo del puerro) y *Tobacco etch virus* (TEV, virus del gravado del tabaco).
- 2 Carlavirus: *Garlic common latent virus* (GarCLV, virus latente común del ajo) y *Shallot latent virus* (SLV, virus latente del shalote).
- 1 Tospovirus: *Irish yellow spot virus* (IYSV, virus de la mancha amarilla irlandesa).
- 1 Fijivirus: *Garlic dwarf virus* (GDV, virus del enanismo del ajo).

Las pérdidas provocadas por las infecciones virales varían y pueden depender, parcialmente, de la interacción agente viral-genotipo. En Argentina, se señala que el *Garlic Virus A* causó reducciones entre 14 y 32 % en la masa del bulbo y entre 6 y 11 % en el diámetro del bulbo de las variedades 'Morado-INTA' y 'Blanco-IFFIVE' (22).

En México, se ha informado que las enfermedades provocadas por virus pueden causar una reducción del

rendimiento entre 33-50 % y hasta el 30 % de la masa de los bulbos, especialmente, cuando la frecuencia de Virus como: Enanismo Amarillo de la Cebolla (OYDV), Jaspeado del Tabaco (LYSV) y Latente del Shallot (SLV), entre otros, es elevada (23).

Para disminuir las fuentes de contaminación se debe preparar el material vegetal antes de llevarse al laboratorio, en una fase de invernadero o fase 0. Esto comprende llevar las plantas a un invernadero, donde por un período de tiempo se les aplica agroquímicos para disminuir las fuentes potenciales de contaminación, que pueden ser hongos o bacterias. Entre las sustancias utilizadas para disminuir la contaminación se encuentra el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio, el cloruro de mercurio (II), el alcohol al 70 % y el peróxido de hidrógeno. Su utilización dependerá del tipo de tejido vegetal (herbáceo o leñoso) o de la cantidad de inóculo contaminante que presente el explante (18).

La utilización del cloruro de mercurio II (HgCl₂) como agente desinfectante constituye un método simple, rápido y eficaz para la obtención de explantes viables y libres de contaminación. Sin embargo, su utilización continúa siendo polémica por su alta toxicidad y elevado nivel de contaminación ambiental, además, puede provocar problemas de oscurecimiento en los tejidos.

3.2. Obtención de plantas libres de patógenos

En la contaminación de los explantes *in vitro* intervienen diversos factores, desde la edad del material vegetal hasta la procedencia, las soluciones desinfectantes, la forma de trabajar en la cámara de flujo laminar por parte del operario y la asepsia del cuarto de crecimiento (14).

En el trópico, se presentan condiciones de elevadas temperaturas y humedad relativa, fuertes precipitaciones y cambios climáticos bruscos, lo que ocasiona microclimas que inciden en la multiplicación y diseminación de hongos, bacterias y levaduras, agentes contaminantes de los medios de cultivo y de los explantes. Estos contaminantes compiten por el espacio y los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo, además de la liberación de sustancias tóxicas por parte de algunos de ellos, que pueden provocar la muerte del explante (24).

Estudios realizados en Cuba (25) han mostrado que en la desinfección del material vegetal para el establecimiento *in vitro*, los mejores resultados se alcanzaron con un 93,37 % de eficiencia cuando se empleó el etanol al 70 % y el hipoclorito de sodio al 3,0 %, durante 25 minutos. Estos resultados se corroboraron con lo informado por otros autores (26), donde se plantea que el hipoclorito de sodio se ha utilizado tradicionalmente solo o en combinación con otros desinfectantes en la descontaminación de los materiales vegetales para establecerse *in vitro*, por su elevado potencial redox de 1,36 mV.

En estudios realizados (27), se seleccionaron genotipos de ajo de elevado rendimiento, de los cuales el genotipo 'Criollo-3' fue saneado de los virus que afectan al cultivo y propagado *in vitro*. El clon mostró un buen comportamiento

agronómico a las plagas, un elevado rendimiento y buena calidad de la "semilla".

Otros resultados muestran que al aumentar la concentración del agente desinfectante (20 % v/v NaOCl) con un tiempo de 15 minutos no se presentó contaminación durante la fase de brotación y se mantuvieron los tejidos en óptimas condiciones para su manejo (28).

El saneamiento de plantas de ajo se realiza mediante cultivo de meristemos, lo cual consiste en cultivar, bajo condiciones *in vitro*, el domo meristemático extraído desde la parte basal del bulbillo de ajo. Debido a que el tejido puede deshidratarse rápidamente, esta técnica requiere de la habilidad de un especialista. La extracción del domo meristemático se realiza después de concluido el periodo de dormancia, cuando el bulbillo está próximo a su brotación. Es importante destacar que, una de las razones que se postulan para explicar la condición libre de virus del tejido meristemático es debido a que la velocidad de replicación y movimiento de las partículas virales es inferior a la tasa de multiplicación celular de este tejido (29).

En estudios para la detección molecular de potyvirus en hojas y minibulbillos de ajo asociados a un programa de producción de semilla sana, se introdujeron un total de 730 meristemos. La desinfección realizada a la "semilla" produjo 100 % de explantes libres de contaminación bacteriana o fúngica. Se presentaron pérdidas en el 31 % de los explantes introducidos, 18 % de los meristemos se perdieron por muerte del tejido o viabilidad. Los porcentajes de establecimiento permitieron validar la producción *in vitro* de ajo en los clones 'Cerrito', 'Santa Rosa' y 'Bogotá'. El 71 % de las plántulas establecidas en un medio de cultivo suplementado con los reguladores 2-iP y ANA mostraron, después de cuatro semanas, una adecuada formación y vigor, conforme a los requerimientos de la etapa; presentaron características deseables, como una altura promedio de 1,5 cm, y el desarrollo de plántulas con 2,5 hojas por plántula y sin raíces (30).

3.2.1. Termoterapia

El empleo de elevadas temperaturas (40-75 °C) para eliminar o reducir la "carga viral" ha sido definida como la producción de un ambiente celular progresivamente menos adecuado para los agentes virales (31) y es un paso previo al cultivo de meristemos para proveer plantas libres de virus. Este último es un proceso que requiere de por lo menos cinco años (32).

En otros estudios (14) se mostró que los resultados del establecimiento *in vitro* en el cultivo del ajo dieron positivos al Virus del Enanismo Amarillo de la Cebolla (OYDV), por lo que con posterioridad se empleó la termoterapia con diferentes tratamientos térmicos y combinado con el cultivo de tejidos vegetales, con la finalidad de erradicar el potyvirus de las plántulas. Los resultados presentados en los ocho tratamientos del cultivar 'Don Fermín' permitió mostrar que la termoterapia, en combinación con el cultivo de tejidos, tiene una respuesta positiva al usar como fuente de explante domos meristemáticos de un tamaño

aproximado de 1 a 2 mm, debido a que se logró obtener material vegetal libre del OYDV.

El empleo de la termoterapia y el cultivo de tejidos para la eliminación del OYDV mostró que los "dientes" expuestos a 40 °C por 40 días no produjeron ningún producto de amplificación del virus, es decir, las plántulas *in vitro* sometidas a dicho proceso no estaban infectadas por dicho virus. Es importante mencionar que la técnica de cultivo de tejidos en combinación con la termoterapia en ápices caulinares (5-8 mm), de un tamaño relativamente grande, resultó ser eficiente en la eliminación del OYDV (6).

Una alternativa de manejo empleada, al alcance de los productores de ajo, es la aplicación de una elevada temperatura directamente a los bulbos para eliminar o reducir la "carga viral", sin dañar su capacidad de germinación o posterior desarrollo (33). También, se ha comprobado que la termoterapia es un método eficaz y de fácil aplicación para reducir la cantidad de inóculo del hongo *Sclerotium* y los nemátodos del género *Ditylenchus* en los "dientes" de ajo (34).

Resultados obtenidos probaron que la termoterapia no tiene efecto depresivo en las futuras plantas cuando éstas proceden de simientes tratadas entre 47-49 °C y tampoco se afecta negativamente la producción. La termoterapia a 49 °C, al ser letal para los parásitos ya instalados en el material de plantación, evita la infección de los terrenos de cultivo del ajo cuando se utilice dicha simiente; lo que consigue un efecto sanitario global positivo (35).

El empleo de elevadas temperaturas influye positivamente en la erradicación de diferentes virus presentes en el cultivo del ajo, tanto en condiciones de campo como a nivel de laboratorio mediante el cultivo de tejidos. Además, el empleo de esta técnica evita la contaminación del suelo o medio de cultivo al utilizar material contaminado.

3.2.2. Quimioterapia

La quimioterapia se define como la terapia mediante la utilización de productos químicos. Los primeros trabajos se realizaron con verde Malaquina contra el virus del mosaico débil o latente en papa (PVX) (36), con muy baja efectividad. En lo adelante han sido empleados numerosos productos contra diferentes virus, pero en la mayoría de las sustancias utilizadas, las dosis no fitotóxicas solo pueden reducir las tasas de multiplicación viral de forma muy limitada (37).

Algunos autores (38) mostraron que, las plantas de ajo del cultivar 'Taiwan', provenientes del cultivo de meristemos *in vitro*, luego de la aplicación del producto químico Rivabirin, solo el 32,5 % de las mismas presentaron lectura negativa a la presencia de virus.

En resultados obtenidos mediante el empleo de la quimioterapia se logró eliminar la incidencia de los virus: OYDV y LYDV en el cultivo del ajo (39). Estudios con la aplicación de virazol, mostraron un 100 % de plantas libres de virus cuando se cultivaron meristemos de 0,3 mm de tamaño en un medio de cultivo MS con 50 mg L⁻¹ del

producto (40). Otros autores informaron plantas de ajo libres de Potyvirus mediante quimioterapia de clavo con Ribavirina 205 μM , con una tasa de supervivencia que osciló entre 27,0-34,8 % (41).

Se demostró que la utilización de compuestos químicos puede influir de manera positiva sobre el cultivo del ajo para la eliminación de diferentes virus, aunque, en ocasiones, el uso de algunos productos solo logra reducir la carga viral en un bajo porcentaje. Asimismo, los tratamientos con productos químicos, por lo general, hay que repetirlos en más de una ocasión.

3.2.3. Electroterapia

El concepto puede definirse como el uso de la corriente eléctrica con fines terapéuticos. Se basa, principalmente, en los fenómenos provocados en los tejidos por el paso de la electricidad, es decir, en el calentamiento por el efecto Joule y en la electrólisis. En la práctica, se utilizan corrientes galvánicas, farádicas y alternas (38).

Las primeras experiencias en la aplicación de corriente eléctrica a través de tejidos vegetales, informaron que encontraron un aumento en los niveles de regeneración de células y tejidos. La electroterapia a "dientes" de ajo, ha sido utilizada en el saneamiento del complejo viral de esta especie, se ha logrado entre un 53-100 % de plantas sanas, al aplicar corriente directa (10-13 v) entre 5-30 minutos (35).

Estudios realizados con el empleo de esta técnica mostraron que dosis superiores a 30 V durante 10 min resultaron letales para el cultivo del ajo (42). A su vez, otros autores (43) mostraron una estimulación del crecimiento de plantas de ajo mediante esta técnica.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el empleo de corriente eléctrica es una técnica favorable para eliminar gran parte de la carga viral presente en el cultivo del ajo, a pesar de no ser muy utilizada.

3.2.4. Empleo de técnicas combinadas para el saneamiento de virus del ajo

Dentro del ámbito de la protección de cultivos, la biotecnología es un proceso dinámico sin el cual no puede llevarse a cabo una agricultura competitiva. Las aplicaciones biotecnológicas contemplan estrategias dirigidas a la detección de patógenos, la obtención y mantenimiento de cultivares libres de patógenos, así como nuevas estrategias para el control de enfermedades para las que no existen vías convencionales. En el pasado siglo se incorporaron, sucesivamente, nuevas tecnologías que permitieron profundizar en la mejora de los cultivos, entre ellas cabe destacar, los cruzamientos interespecíficos y el cultivo *in vitro* (37).

Algunos autores utilizaron termoterapia, quimioterapia y cultivo de meristemas en combinación para obtener plantas de ajo libres de virus del grupo Potyvirus. Los embriones se obtuvieron de clavos (explantes) que habían sido sometidos a quimioterapia y las plantas regeneradas a partir de embriones recibieron tratamiento de termoterapia.

Estos meristemas se cultivaron y las plantas obtenidas se indexaron mediante ELISA y se encontró que la termoterapia tiene un efecto negativo en el establecimiento de las plantas. Pero la termoterapia en combinación con el cultivo de meristemas demostró ser un método más eficaz para la eliminación del virus (60,0-70,9 %) que el cultivo de meristemas solo (64 %). Sin embargo, informaron que la quimioterapia no fue efectiva para la eliminación del grupo Potyvirus (41).

Otros autores probaron métodos de electroterapia, termoterapia, quimioterapia o disección meristemática (cultivo *in vitro*) para eliminar el virus OYDV de *Allium sativum* L. (44). Combinaron métodos de electro y quimioterapia (15 mA/10 min + 20 mg L⁻¹ Virazol) y obtuvieron los mejores resultados, el 85 % de las plántulas que sobrevivieron estaban libres del virus OYDV.

En estudios realizados (45) se trataron "dientes" de ajo para su saneamiento con agua y aire caliente en cámara de crecimiento y en invernadero. Los tratamientos con agua caliente fueron de 50 y 55 °C durante 5, 15 y 20 minutos, su eficiencia fue tan sólo del 13 % de saneamiento. Con aire caliente se aplicó una temperatura de 36 °C durante 30, 40 y 60 días, el porcentaje de regeneración disminuyó al incrementarse el tiempo de aplicación y se aumentó la eficiencia del saneamiento, se alcanzó hasta un 100 % con 60 días de aplicación.

3.2.5 Técnicas empleadas para el diagnóstico de virus en ajo

Los métodos confiables, rápidos y rentables para la detección de virus del ajo juegan un papel importante en el control y manejo de las enfermedades virales. El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) y la reacción en cadena de la polimerasa de la transcripción reversa (RT-PCR) se han utilizado para el diagnóstico de los virus del ajo (46). Sin embargo, los antisueros utilizados en el método de ELISA no siempre están disponibles para todos los virus y su diagnóstico se vuelve complejo debido a las múltiples infecciones virales; en cambio, la RT-PCR ha demostrado ser más sensible al detectar los virus en muy bajas concentraciones (47).

Para la detección de complejos virales en el cultivo del ajo (48) se utilizó la técnica de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Mediante dicha prueba se observó la presencia de cinco virus: los Potyvirus: Virus del Estriado Amarillo del Puerro (LYSV) y Virus Enanismo Amarillo de la Cebolla (OYDV); los Carlavirus: Virus Latente del Shallote (SLV) y Virus Latente Común del Ajo (GCLV); y el Tospovirus: Virus del Estriado Amarillo del Iris (IYSV) en el follaje de los ecotipos evaluados. En tres fechas de muestreos diferentes se detectó que el LYSV tuvo una frecuencia del 100, 100 y 100 %; en el OYDV las frecuencias de muestreos fueron de 50, 75 y 77,7 %; en el SLV de 19,4; 30,5 y 0 %; en el GCLV de 100; 97,2 y 91,6 %; y en el IYSV de 0,0; 2,7 y 22,2 %.

Estudios realizados en dicho cultivo (49) revelaron para las 54 muestras analizadas por RT-PCR la presencia de dos a cinco virus en cada planta, teniendo una tasa de coinfección del 100 %. Dos muestras (3,7 %) contenían

2 virus, seis muestras (11,11 %) contenían 3 virus, diez muestras (18,52 %) contenían 4 virus y, 36 muestras (66,67 %) contenían 5 virus. Las variedades de ajo 'Tigre' y 'Fermín' mostraron mayor frecuencia de virus que la variedad 'California'.

3.3. Micropropagación del ajo

La propagación vegetativa de plantas mediante el uso de técnicas de cultivo *in vitro* se conoce comúnmente como micropropagación, término que hace referencia a que la cantidad de material vegetal necesaria para iniciar el cultivo es pequeña, mucho menor que en las técnicas tradicionales de propagación vegetativa. Existen diferentes opciones para realizar propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro* (50):

- La multiplicación a partir de yemas pre-existentes (apicales o axilares).
- La formación de brotes adventicios o embriones somáticos adventicios, a partir de: explantes constituidos por porciones de tejidos u órganos extraídos de la planta madre, células desorganizadas (suspensiones celulares) o tejidos (cultivos de callos) establecidos por proliferación celular en el propio explante.

La micropropagación puede ser usada con un enfoque de conservación, ya que permite obtener numerosas plántulas en tiempos cortos y espacios reducidos (51). Las principales ventajas que nos ofrece (52), comparado con los métodos tradicionales son:

- La regeneración de las plántulas es más rápida debido a que ocurre en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo, así como los medios químicamente definidos en los cuales se manipula la cantidad de los nutrientes y reguladores de crecimiento.
- Se requiere de pequeñas proporciones de tejido vegetal para iniciar el establecimiento aséptico.
- Es posible propagar genotipos que con los métodos tradicionales presentan cierto grado de dificultad y permite obtener mayor cantidad de material vegetativo de elevada calidad biológica.
- Es posible producir plántulas *in vitro* en cualquier época del año.

Las fases de desarrollo en laboratorio (53) que involucra la tecnología son tres:

- Fase de establecimiento *in vitro*: Se inicia con la implantación de meristemas (tejido apical) en un medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de las plántulas *in vitro*.
- Fase de multiplicación *in vitro*: Las plántulas *in vitro* regeneradas se transfieren a un medio de cultivo con auxinas y citoquininas para la inducción de la formación de brotes laterales, es menor en el primer subcultivo y aumenta con los siguientes subcultivos. Este ciclo de multiplicación dura entre 4-8 semanas aproximadamente,

en dependencia del genotipo, y se repite hasta lograr obtener la cantidad de plántulas deseadas.

- Fase de microbulbificación *in vitro*: Se separan los macollos y se colocan en magentas o tubos y se induce la formación de microbulbillos al incrementar la concentración de sacarosa a 3, 6, 9 y 12 %. Cuando alcanzan el tamaño y diámetro adecuados y toman una coloración morada, se extraen y se dejan secar para, posteriormente, pasarlos a la fase de invernadero.

Estudios realizados a partir de la multiplicación rápida de ajo *in vitro* (54) lograron la micropropagación al utilizar el medio de cultivo MS con 0,57 μM de AIA y 0,44 μM de BA para el cultivo inicial de brotes, y posteriormente, el medio de cultivo MS suplementado con 170 mg L^{-1} de NH_2PO_4 .

3.3.1. Empleo de reguladores del crecimiento tradicionales

Estudios realizados mostraron que la iniciación de brotes ocurrió en el 98 % de los ápices cultivados en las sales del medio de cultivo basal MS suplementado con 0,5 mg L^{-1} de 2-iP y 0,1 mg L^{-1} de ANA, esto permitió el desarrollo de un solo brote por tubo de ensayo con un promedio de altura entre 4-4,6 cm. La máxima altura se observó en el tratamiento T_2 (0,01 mg L^{-1} de 2,4-D y 5 mg L^{-1} de Kin) con 9,9 cm de altura, seguido por el T_3 (0,01 mg L^{-1} de 2,4-D y 5 mg L^{-1} de 6-BAP) con 8,2 cm, mientras que en el T_3 se obtuvo el mayor número de brotes por callo (3,9) seguido por el T_2 con 2,2 brotes por callo. En ausencia de reguladores de crecimiento [T_1 (MS)] no hubo caulogénesis. Estos resultados indicaron que la composición del medio nutritivo repercutió sobre la capacidad de regenerar brotes. Al respecto, se requirió una mayor proporción de citoquininas (Kin, 6-BAP) que de auxinas (2,4-D) en el medio de cultivo. En este caso, las citoquininas parecen jugar un papel específico para la regeneración de brotes a partir de callos, probablemente al determinar la ruta de la diferenciación hacia la caulogénesis (55).

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a pesar de ser una auxina que a bajas concentraciones puede favorecer la inducción de brotes, no es muy recomendable su empleo en procesos de micropropagación ya que puede inducir variabilidad genética en los regenerantes obtenidos.

En el cultivo del ajo, con el ecotipo 'Colorado de Mendoza', se alcanzó el mayor número de raíces (2,5 raíces) con las sales del medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog con vitaminas sintéticas), mientras que el medio de cultivo MSM + EQ (Sales de Murashige y Skoog Modificado, sustitución de KNO_3 , MgSO_4 , NH_4NO_3 + extracto de quinua) fue el que obtuvo el menor número de raíces, uno (56) como promedio. El ecotipo 'Rosado de Italia' fue el que alcanzó el mayor promedio en cuanto al número de raíces (3,3 raíces) en presencia del medio de cultivo MSM (Sales de Murashige y Skoog Modificado, sustitución de KNO_3 , MgSO_4 , NH_4NO_3), mientras que con el medio de cultivo MSM +EQ se obtuvo el menor número de raíces (1,6 raíces) (57).

Con el medio de cultivo MSM (Murashige y Skoog Modificado con sales comerciales) suplementado con los reguladores de crecimiento Kinetina (1 mg L^{-1}) y Ácido Indolacético (2 mg L^{-1}) se logró una mayor regeneración de brotes adventicios, un promedio de 2,1 brotes por explante para el ecotipo 'Colorado de Mendoza' y un brote por explante para el ecotipo 'Rosado de Italia' (57).

3.3.2. Empleo de bioestimuladores del crecimiento

El Biobras-6® y Pectimorf® se pueden utilizar como reguladores del crecimiento en todas las fases de la micropropagación del ajo clon 'Criollo-9'; la combinación AIA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y Biobras-6® ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) o AIA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) y Pectimorf® (1 mg L^{-1}) aumentó el establecimiento *in vitro* de los ápices caulinares y disminuyó entre tres y cuatro días el tiempo de permanencia de los explantes en el medio de cultivo, con respecto al tratamiento control (AIA y 6-BAP). Para la obtención de brotes múltiples fueron mejores las combinaciones ANA ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$) y Biobras-6® (2 mg L^{-1}) y AIA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) y Pectimorf® (10 mg L^{-1}). La supervivencia y el enraizamiento durante la aclimatización de los microbulbillos fue superior, con la inmersión previa en Biobras-6® (1 mg L^{-1}) o Pectimorf® (10 mg L^{-1}) durante 15 minutos y la plantación posterior en un sustrato compuesto por zeolita cargada [Litonita] (25 %) y materia orgánica [cachaza descompuesta] (75 %). Las evaluaciones agronómicas evidenciaron que el Biobras-6® produjo un rendimiento de 12,42 y el Pectimorf® 11,67 t ha^{-1} , superiores en 4,47 y 2,72 t ha^{-1} , respectivamente, en relación con las plantas control (2).

Otros estudios con el empleo de sacarosa mostraron que el comportamiento de las plántulas *in vitro* y microbulbillos de ajo de diferentes genotipos ('Criollo-9', 'Martínez', 'Criollo-6', 'Criollo-3' y 'Vietnamita') respecto al porcentaje de supervivencia en la fase de aclimatización, la respuesta más efectiva se obtuvo a partir de los microbulbillos inducidos *in vitro* con 75 g L^{-1} de sacarosa. En el caso de las plántulas *in vitro*, la supervivencia osciló de 39,50-49,62 % y para los microbulbillos entre 90,70-94,95 %, los mejores valores los alcanzaron los clones 'Criollo-9' y 'Martínez', con 94,95 y 93,56 %, respectivamente (17).

3.4. Embriogénesis somática en ajo

La embriogénesis somática permite regenerar plantas completas, y es ampliamente usada por la biotecnología y en estudios de embriología, su principal ventaja es la producción de numerosas plántulas a partir de una célula y permite la evaluación y mejoramiento genético (8).

Estudios en ajo evidenciaron que el promedio más elevado de embriones somáticos (173,71 por 200 mg de callo) se logró después de 8 semanas de cultivo en un medio de cultivo que contenía una combinación de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-BAP y $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D. Sin embargo, el número disminuyó al aumentar la concentración de 2,4-D. El estudio también indicó que la reducción del nivel de 2,4-D en el medio de cultivo contribuyó a promover un mayor número de embriones somáticos durante el subcultivo. Sin embargo, el crecimiento del callo embriogénico con

embriones globulares disminuyó con el aumento de la concentración de BAP ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ o más) y 2,4-D ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ o más) (58).

La embriogénesis somática no es más que la formación de un embrión a partir de una célula somática, sin la necesidad de la fusión de gametos. Esta técnica se ha utilizado en todo el mundo para la producción masiva de plantas por cultivo *in vitro* en algunas especies vegetales como zanahoria (*Daucus carota* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.), a pesar de no ser conocida con exactitud la biología del proceso. Existen varios pasos para la regeneración de plantas por esta vía, los cuales están muy relacionados entre sí: inducción y desarrollo de los embriones somáticos, proliferación, maduración, germinación y conversión en plantas. Generalmente, se utilizan medios con altas concentraciones de sales, sacarosa o manitol y se necesita la presencia de una auxina para la iniciación del callo embriogénico, habitualmente 2,4-D. Como la maduración y la germinación de los embriones no ocurren en presencia de esta auxina, se debe remover o usarla en bajas concentraciones para permitir el desarrollo de estos. Además, tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes dependen de la presencia de nitrógeno reducido.

3.5. Conservación *in vitro* de germoplasma de ajo

Los bancos de germoplasma *in vitro* son sitios para la conservación de los recursos genéticos en condiciones controladas de laboratorio y que involucran diversas técnicas de cultivo y almacenamiento *in vitro*. En los mismos se busca maximizar la diversidad de ejemplares recolectados de poblaciones en campo o en su centro de origen (56).

Su germoplasma se conserva mediante colecciones de campo o por métodos biotecnológicos. En el Banco de Germoplasma del INIFAT se ha trabajado durante los últimos 10 años en la conservación de germoplasma de ajo por reducción de la tasa de crecimiento y en la actualidad se cuenta con una colección de clones de interés; los que son conservados, en dependencia del genotipo, por ciclos que oscilan entre los 9 meses y un año (59).

3.5.1. A mediano plazo

En el almacenamiento por corto plazo los explantes permanecen *in vitro* hasta 12 meses, con un manejo de las condiciones de cultivo para retrasar el crecimiento y aumentar los intervalos entre subcultivos (60).

Resultados alcanzados demuestran que a la temperatura de $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó la reducción de la tasa de crecimiento del cultivo del ajo, pues se requirió de mayor tiempo para que las plantas alcanzaran la altura de 5 cm, y que resultara evidente la bulbificación y se produjera el enraizamiento profuso (de 3-5 raíces). El efecto de la disminución de la temperatura de conservación en dicho enraizamiento fue notable, ya que el tiempo para alcanzar el enraizamiento fue aproximadamente 5 veces el requerido

a 24 °C. La contaminación observada fue baja por lo que no parece ser un aspecto limitante. El contenido del medio de cultivo en los tubos para ensayos decreció en un 25 % respecto al inicial, de modo que las plántulas llegaron a alcanzar el año de conservación y aún se mantenía, aproximadamente, un 75 % del contenido del medio de cultivo (61).

Otros estudios sobre conservación *in vitro* (62) informaron que durante el cultivo de microbulbos de *A. sativum* L., en cinco medios de conservación *in vitro* almacenados en ¼ MS con 45 g L⁻¹ de sacarosa (T4), mostraron porcentajes de supervivencia de 86,6; 76,6 y 73,3 % a los 150, 180 y 210 días, respectivamente. Así mismo, registraron el mejor vigor con valores promedio de 1,16; 0,93 y 1,04 según la escala establecida (1= bulbos definidos en un 75 %; 2 = bulbos definidos en un 50 %; 3 = bulbos definidos en un 25 % y 4 = ausencia de bulbos o bulbos no definidos) a los 150, 180 y 210 días de evaluación, respectivamente.

Otros estudios mostraron que, respecto al índice de bulbificación todas las plantas de ajo conservadas a 24 °C habían bulbificado a los 4 meses de conservación. A 6 °C no se observó bulbificación hasta los 6 meses y la bulbificación de todas las plantas se apreció a los 10 meses (63).

3.5.2. A largo plazo

El almacenamiento por largo plazo es muy seguro por lo que se usa extensivamente en agricultura, horticultura, y forestería para la investigación y el monitoreo ambiental. Se considera que el almacenamiento por largo plazo es una práctica útil para evitar la variación somaclonal en plantas con propagación vegetativa y permite mantener los explantes sin alteración alguna bajo estas condiciones (64).

Estudios realizados mostraron que el cultivo de brotes de tres cultivares de ajo se mantuvo a diversas temperaturas y medios de cultivo para mantener su viabilidad sin subcultivos (65). Como resultado se registró un elevado nivel de viabilidad después de 16 meses de cultivo a 4 °C con 100 g L⁻¹ de sacarosa en medio B-5.

3.5.3. Crioconservación

La crioconservación permite el almacenamiento de células, tejidos u órganos vegetales vivos a temperaturas extremadamente bajas (-80 °C). Esta técnica permite el almacenamiento durante períodos prolongados (mayores a un año) con el uso de nitrógeno líquido (NL), el cual normalmente se encuentra a -196 °C. En algunas ocasiones, se combina el NL con otros gases inertes (como el helio y el argón) (59).

En el caso de los clones de ajo 'Castaño INTA', 'Sureño INTA' y 'Morado INTA' se obtuvo 96,7, 92,9 y 89,3 % de explantes brotados, respectivamente, cuando se crioconservaron ápices de "dientes" mediante la metodología de la gota congelada (66).

En el IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste) se desarrollaron protocolos para bulbillos aéreos y ápices de

"dientes" y se empleó el método de encapsulamiento-deshidratación con descenso térmico rápido y lento. Los ápices fueron encapsulados con 3 % de alginato de calcio. Las cápsulas fueron precultivadas en tres soluciones de concentraciones crecientes de sacarosa (0,5; 0,75; 1 M) en agitación permanente a 80 rpm. La deshidratación se realizó con gel de sílice durante 5 horas. Posteriormente, los ápices fueron colocados en el equipo de descenso programado de temperatura e introducidos en nitrógeno líquido (24 horas). Luego fueron descongelados a 30 °C durante dos minutos, rehidratados en medios líquidos con concentración decreciente de sacarosa (0,75 y 0,5 M) y recultivados en medio Murashige y Skoog (1962) modificado. Esta metodología permitió obtener aproximadamente el 95 % de regeneración para ápices de "dientes" de 3 clones; sin embargo, los bulbillos aéreos no sobrevivieron a los tratamientos previos (67).

3.6. Técnicas empleadas para detectar variabilidad genética en las plántulas de ajo obtenidas por cultivo *in vitro*

3.6.1. Técnicas morfológicas

En los estudios morfológicos, los caracteres deben ser descubiertos y delimitados generalmente sin ningún criterio explícito para la selección o la codificación del carácter, por lo que tienen el potencial de ser arbitrarios. Sin embargo, tienen la ventaja de permitir un muestreo taxonómico mucho más cuidadoso que el que se realiza con análisis moleculares, lo que es importante para las revisiones sistemáticas, los estudios de la evolución del carácter y la valoración filogenética (68).

Estudios realizados en ajo (63) evidenciaron que el clon 'UCLA-1' (grupo III) se destacó del resto de los materiales por presentar los mayores valores para las características relacionadas con el bulbo y el follaje. Los clones 'AN-2' y 'AN-1' (grupo I), con idéntico perfil electroforético, mostraron diferencias morfológicas, ya que 'AN-2' mostró en comparación con 'AN-1', elevados promedios para la altura y el número de hojas por planta, así como para las características masa y diámetro del bulbo.

En lo que se refiere a las características relacionadas con el follaje de la planta, el cultivar 'PAL-1' presentó el mayor promedio para la altura de la planta, con un valor de 59,2 cm seguido de los cultivares 'AN-1', 'BO-4' y 'AN-2'; mientras que el cultivar 'SAL-2' resultó con el menor valor para esta característica del follaje (63).

3.6.2. Técnicas citogenéticas

Actualmente, existen técnicas citogenéticas como las llamadas FISH (hibridación *in situ* por fluorescencia) y GISH (hibridación *in situ* del genoma) en las que se hace uso de tintes para marcar regiones diferentes del ADN. Ambas técnicas se utilizan para identificar cromosomas extraños o para detectar traslocaciones (cambios de posición de partes del cromosoma) en híbridos, lo cual no es posible con las técnicas de citogenética clásica como la tinción o el bandeado (54).

En estudios sobre la detección de la variación somaclonal en ajo mediante análisis citológico se examinaron los cariotipos de 75 regenerantes derivados de los cultivos de callos de tres clones de ajo parentales y se encontró que el 9,3 % eran tetraploides, el 4 % aneuploides y el 2,6 % mostró un cambio en la posición de la constricción secundaria. No se pudo demostrar ninguna asociación entre la tasa de variación de los caracteres moleculares y citológicos, ya sea al comparar cultivares o examinar regenerantes individuales (54).

Las diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento (kinetina, ácido indol-3-ilacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en los medios de cultivo de tejidos vegetales, a bajas concentraciones, no tienen ningún efecto sobre la inducción de aberraciones mitóticas o la inhibición de la actividad mitótica en células del meristemo de la raíz de *Allium sativum* L. Luego de estudios realizados, se observó inhibición de la actividad mitótica, tendencia a la adherencia y aglutinación de los cromosomas y un ligero aumento en la frecuencia de aberraciones mitóticas a concentraciones más altas. Por lo que se puede decir, que los medios de cultivo de tejidos vegetales no tienen un efecto directo sobre la inducción de aberraciones mitóticas en cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (69).

Estudios realizados para validar el uso de *Allium sativum* L. como un modelo de prueba sensible para genotoxicidad, evaluaron los efectos citogenéticos de una formulación comercial del insecticida piretroide, Cipermetrina, en las células del meristemo de la raíz de *A. sativum*. Para el ensayo citogenético, las células del meristemo de la raíz se expusieron a 1; 2; 4; 8 y 16 ppm (mg L^{-1}) del compuesto de prueba durante 24 h, y se procesaron inmediatamente para el análisis o se incubaron en agua durante 24 h de recuperación y luego se procesaron. Las células analizadas inmediatamente después de la exposición presentaron una inhibición significativa dependiente de la dosis del índice mitótico (IM) y la inducción de aberraciones mitóticas y cromosómicas (AM y AC). El período de recuperación de 24 h redujo el efecto del compuesto de prueba sobre el IM y el porcentaje de aberraciones; sin embargo, las células expuestas a 8 y 16 ppm mostraron una frecuencia significativa de aberraciones a pesar del período de recuperación. Los datos indicaron que dosis más elevadas de Cipermetrina producían toxicidad, AC y MA en *A. sativum* L (70).

3.6.3. Técnicas isoenzimáticas

Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se demostró dentro de un organismo la existencia de las isoenzimas, formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza, debido a un cambio de movilidad electroforética. Esta sensibilidad electroforética hizo que la técnica haya revolucionado los estudios de diversidad genética en diversas especies (54).

Para tales estudios se han utilizado varias estructuras de la planta, hojas, raíces o botones florales, de las cuales se obtiene un extracto crudo proteico. La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón, PAGE), bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un teñido histoquímico. La separación se realiza mediante la carga eléctrica neta, masa molecular, punto isoeléctrico y combinación de estos criterios (separación multidimensional). De este modo se separan las enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alelos de un mismo gen (54).

M. tumefaciens según el ensayo histoquímico permitió detectar la actividad del gen GUS en los 30 clones obtenidos en el tratamiento de inoculación I2, el cual consistió en secar los callos al ser expuestos al aire de una campana de flujo laminar durante 10 min, después se sumergieron en la suspensión durante 5 min y se colocaron sobre una toalla de papel esterilizada, pero con diferente magnitud. El 43 % de ellas (13 colonias) mostraron una coloración azul intensa, mientras que en el resto la coloración fue más tenue (54).

Algunos autores evaluaron los efectos de una dosis aguda de rayos γ (10 Gy) a dientes de ajo post-latentes sobre el crecimiento interno de los brotes y los cambios en las peroxidasa y proteínas solubles hasta 100 días de almacenamiento en la oscuridad a 19 ± 1 °C y 42 ± 2 % de humedad relativa. La inhibición del crecimiento de brotes inducida por radiación se hizo evidente después de 25 días de tratamiento y fue sincrónica con un marcado aumento en la actividad de peroxidasa. El enfoque isoeléctrico de capa fina reveló que la radiación inducía un aumento en el número de isoenzimas de peroxidasa anódica a los 100 días, lo que sugiere modificaciones en el proceso de vascularización. Ni el contenido de proteína soluble ni el patrón de proteína se vieron afectados por la irradiación. Estos resultados se discuten en términos de un posible efecto mediador de la peroxidasa sobre la inhibición de brotes inducida por radiación en el ajo (71).

3.5.4. Técnicas moleculares

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambos métodos han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros (72).

Estudios realizados sobre la diversidad genética de poblaciones de ajo evidenciaron que el ADN aislado de 71 muestras analizadas por la técnica de AFLP™ detectó un alto nivel de polimorfismo para la diferenciación de las muestras en estudio. Se esperaba que las diferencias genéticas no fueran tan marcadas, debido a que se trata de

una especie apomíctica obligada y exige reproducción clonal desde hace, aproximadamente, 5000 años (73).

Estudios realizados con la técnica AFLP mostraron un total de 130 bandas claramente separadas. Todas las bandas cuantificadas fueron monomórficas (100 %), por lo que la distancia filogenética fue 0. Se detectó el mismo número de bandas con cada conjunto de cebadores en una planta parental recolectada en campo y en aquellas sometidas a tres tratamientos de cultivo diferentes (Medio MS, control absoluto, medio MS + ANA (0,1 mg L⁻¹) + Kin (8 mg L⁻¹), Medio MS suplementado con ANA (0,1 mg L⁻¹) + 2-iP (4 mg L⁻¹) en tres subcultivos, respectivamente. Este análisis indica que no hubo diferencias a nivel molecular entre las plántulas *in vitro* regeneradas en los diferentes medios de cultivo, en los tres subcultivos que se realizaron y el stock de campo, para las combinaciones de cebadores que se analizaron (72).

Las técnicas empleadas para detectar variabilidad genética en las plántulas de ajo obtenidas por cultivo *in vitro* son muy utilizadas en todo el mundo con buenos resultados. Con el empleo de las mismas se pueden identificar cromosomas extraños, detectar traslocaciones y facilita el muestreo taxonómico de plantas mucho más cuidadoso. Además de detectar los niveles de polimorfismo a partir de tecnologías basadas en ADN.

Otros estudios mediante la combinación de cebadores de ASLSM2 produjeron 11 alelos (bandas de diferentes tamaños) entre los 25 clones de ajo evaluados. Por otro lado, la combinación de cebadores de ASLSM4 produjeron solo 1 alelo polimórfico, que estaba presente solo en los clones de ajo agrupados en los grupos AFLP VII y X. Otras combinaciones de cebadores, ASLSM1 y ASLSM3, produjeron alelos polimórficos 7 y 5, respectivamente (74).

El empleo de técnicas moleculares basadas en ADN ha sido muy utilizado para evaluar la integridad genética de los bancos de germoplasma o para detectar la presencia de variaciones genéticas en materiales sometidos a un tratamiento mutagénico, por lo que se considera un gran avance en la biotecnología vegetal.

CONCLUSIONES

- La Biotecnología permite, mediante el cultivo de tejidos o *in vitro*, la obtención de plantas más resistentes y libres de patógenos y virus, en tiempos cortos y espacios reducidos.
- La micropropagación puede ser usada con un enfoque de conservación, pues permite obtener numerosas plantas libres de patógenos y virus, en tiempos cortos y espacios reducidos. Además, permite el empleo de diferentes bioestimuladores del crecimiento como Biobras-6® y Pectimorf® para sustituir o complementar los reguladores tradicionales.
- La embriogénesis somática permite regenerar plantas completas, y es ampliamente usada por la biotecnología y estudios en embriología, su principal ventaja es la producción de numerosas plantas a partir de una célula.

- Con el uso de técnicas de cultivo *in vitro* se pueden producir plántulas durante todo el año y, posteriormente, someterlas a la fase de aclimatización donde se logra mayor supervivencia y desarrollo antes de pasar a las condiciones de campo.
- El empleo de elevadas temperaturas (40-75 °C), productos químicos y corriente eléctrica combinado con el cultivo de meristemos son técnicas eficaces para la disminución o erradicación de virus presentes en el cultivo del ajo, ya sea en condiciones de campo o a nivel de laboratorio mediante el cultivo de tejidos
- Las técnicas empleadas para detectar variabilidad genética en plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* permiten divisar traslocaciones y diferentes niveles de polimorfismo, además de la identificación de cromosomas extraños.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Filippis LF. Crop improvement through tissue culture. En: Ahmad P, Wani MR, Azooz MM, Tran L-SP, editores. Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes: Volume 1 [Internet]. New York, NY: Springer; 2014 [citado 29 de marzo de 2021]. p. 289-346. doi: http://doi.org/10.1007/978-1-4614-8830-9_12
2. Izquierdo Oviedo H, Gómez O. Criollo-9, un cultivar de ajo resistente a las enfermedades fitopatógenas y elevado potencial de rendimiento. Cultivos Tropicales. 2012; 33(2):68-68. Available in http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000200010&lng=es&nrm=iso
3. Burba JL. Garlic (*Allium sativum* L.) genetic improvement and seed production. Possibilities of adaptation to variable environments. Colombian Journal of Horticultural Science. 2009; Available in: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CO201000115>
4. Messiaen C-H. Les allium alimentaires reproduits par voie végétative. Editions Quae; 1993. 302 p. Available in: <https://www.torrossa.com/en/resources/an/5063957>
5. Velásquez-Valle R, Reveles-Hernández M, Chew-Medinaveitia YI, Reveles-Torres LR. Effect of thermic treatment on the presence of virus in garlic (*Allium sativum* L.) bulbs. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. 2017;49(1):157-65. Available in <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183099869>
6. Carbajal Cruz NN. Termoterapia y cultivo *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) para la eliminación del virus del enanismo amarillo de la cebolla. [Internet] [Masters]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2018 [citado 29 de marzo de 2021]. 89 p. Available in: <http://eprints.uanl.mx/15790/>
7. Donoso-Huaral IEEA. Producción de semilla de ajo, empleando la técnica de micropropagación en el Perú. 2013; Available in: http://200.123.25.5/bitstream/20.500.12955/506/1/Trip-Semilla_de_Ajo.pdf
8. Khan S, Al-Qurainy F, Nadeem M. Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and

- endangered plants of Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012;19(1):1-11. doi: <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.11.001>
9. Hillis DM, Wiens JJ. Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. Phylogenetic analysis of morphological data. 2000;1-19. Available in: <https://eurekamag.com/research/021/364/021364068.php>
 10. Ríos E, Ruiz HM, Castañeda ST. Marcadores moleculares: una revolución en la Zoología. Obtenido de http://www.RevistaCiencia.Amc.Edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf. 2009;
 11. Becerra V. V, Paredes C. M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica. 2000;60(3):270-81. doi: <http://doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>
 12. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 2010;258. Available in: <http://up-rid2.up.ac.pa:8080/xmlui/handle/123456789/1462>
 13. Mujica H, Mogollón N. Bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) Con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. Bioagro. 2004;16(1):55-60. Available in: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1316-33612004000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=en
 14. Brenes-Madriz JA, Guillén-Watson AV. Establecimiento de un protocolo *in vitro* para el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) en Costa Rica. Revista Tecnología en Marcha. 2014;27(4):pág-49. Available in: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/4104>
 15. Izquierdo H. Propagación *in vitro* de genotipos cubanos de ajo (*Allium sativum* L.) [PhD Thesis]. Tesis de Maestría; 2000. Available in: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1223950>
 16. Nodari RO, Guerra MP. La bioseguridad de las plantas transgénicas. Los transgénicos en América Latina y el Caribe: un debate abierto. Santiago de Chile: CEPAL. 2004;111-22. Available in: <https://ideas.repec.org/b/ecr/col015/2409.html>
 17. Izquierdo H, Quiñones Y, Disotuar R, Pedroso D. Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatación de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.). Cultivos Tropicales. 2002;23(3):63-69. Available in: <https://link.gale.com/apps/doc/A146790764/AONE?u=anon~e52262bd&sid=googleScholar&xid=bb3f669f>
 18. Vazquez C, Bejerano MJ, Peralta EL, Dalmau E. Metodología de desinfección de *Allium sativum* L para su implantación *in vitro*. Cultivos Tropicales. 1997;18(3):76-79. Available in: <https://ediciones.inca.edu.cu/files/anteriores/1997/3/CT18314.pdf>
 19. López Quintero L, Escobar Velásquez H, Parra Fuentes M. Establecimiento de plántulas *in vitro* de clones de ajo peruano (*Allium sativum* L.). Revista Mutis; Vol. 4, Núm. 1 (2014); 62-66 [Internet]. 2017 [citado 29 de marzo de 2021]; DOI: <http://doi.org/10.21789/22561498.911>
 20. Panattoni A, Luvisi A, Triolo E. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Spanish journal of agricultural research. 2013;(1):173-88. Available in: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4183676>
 21. Conci VC, Canavelli A, Lunello P, Di Rienzo J, Nome SF, Zumelzu G, et al. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. Plant Disease. 2003;87(12):1411-1415. Available in: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2003.87.12.1411>
 22. Megino LV, Hernando ECC, González CI, Llamas DP. Influencia de la temperatura de termoterapia: El rendimiento del cultivo del ajo. Terralia. 2009;(74):32-4. Available in: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3113290>
 23. Pérez-Moreno L, Santiago-Gómez D, Rico-Jaramillo E, Ramírez-Malagón R, Mendoza-Celedón B. Efecto de virus fitopatógenos sobre características agronómicas y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado de Guanajuato, México. Revista mexicana de fitopatología. 2008;26(1):40-8. Available in: <https://www.redalyc.org/pdf/612/61226107.pdf>
 24. Alvarado F. Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. Revista CENIC ciencias biológicas. 2000;31(2):25-31. Available in: <https://revista.cnic.edu.cu>, article, download
 25. Guerra DG, Morales SJR, Vazquez KD, Jiménez AR, Cabrera AR. VIUSID Agro® en la propagación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.). Agricultura Tropical. 2019;5(1):34-44. Available in: <https://1library.co/document/qvjoj7dq-viusid-agro-propagacion-in-vitro-ajo-allium-sativum.html>
 26. Quiala E, Barbón R, Jimenez E, De Feria M, Chávez M, Capote A, et al. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *in vitro* Cellular & Developmental Biology - Plant. 2006;42(3):298-300. doi: <http://doi.org/10.1079/IVP2006765>
 27. Izquierdo H, Gómez O. Criollo-3, un genotipo de ajo de elevada productividad. Cultivos Tropicales. 2010;31(3):58-9. Available in: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0258-59362010000300010
 28. Cárdenas Avila ML. Cultivo *in vitro* de brotes de ajo *Allium sativum* L. de tres variedades obtenidas en Marín, NL, México.[por] María Luisa Cárdenas Avila. 1995;
 29. Madariaga M, Ramírez I, Nuñez Y, Molina A, Horta M. Producción de plantas de ajo libre de virus. Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 2020;
 30. Parra-Fuentes M, Reyes-Perdomo C, Hernández-Fernández J. Detección molecular de potyvirus en hojas y minibulbillos de ajo, *Allium sativum* L., asociados a un programa de producción de semilla limpia. Revista Colombiana de Biotecnología. 2014;16(2):30-36. Available in: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.47237>.
 31. Velásquez-Valle R, Reveles Hernández M, Velásquez-Valle R, Reveles Hernández M. Efecto de la termoterapia sobre la emergencia y características vegetativas de genotipos de ajo. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 2019;10(2):447-52. doi: <http://doi.org/10.29312/remexca.v10i2.1522>
 32. Norris DO. Development of virus-free stock of Green Mountain Potato by treatment with malachite green.

- Australian Journal of Agricultural Research. 1954;5(4): 658-63. doi: <http://doi.org/10.1071/ar9540658>
33. Ponce P, Juan N. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. JN Pérez Ponce editor principal; editores Yelenys Alvarado Capó...[et al.]. 1998; Available in: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DO2003100118>
34. Wagele R. Procedimiento para influir en el crecimiento de células e individuos bacterianos, animales y vegetales. Patentans Piiche. 1978;28(41):933.
35. Hernandez R, Fontanella J, Noa JC, Manso R, Pichardo T, Cárdenas H. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L., con optimización del diagnóstico por um-elisa. 24. 1. Total de registros: 1 BD FAUSAC Ayuda MegaBase Agropecuaria Alianza SIDALC. 1991; Available in: <https://catalogosiidca.csu-ca.org/Record/UNANI.054555>
36. Carhuaricra E K, Olivera S J, Gonzales A J, Rodríguez L J. Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. Revista Peruana de Biología. 2012;19(3):341-4. Available in: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1727-99332012000300017&lng=es&nrm=iso&tlng=es
37. Cafrune EE, Perotto MC, Conci VC. Effect of two Allxivirus isolates on garlic yield. Plant Disease. 2006;90(7):898-904. doi: <http://doi.org/10.1094/PD-90-0898>
38. Dena Silva M. Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus del ajo (*Allium sativum* L.) [PhD Thesis]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 1997. Available in: <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/6391>
39. Manjunathagowda DC, Gopal J, Archana R, Asiya KR. Virus-free seed production of garlic (*Allium sativum* L): Status and Prospects. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;6(6):2446–2456. Available in: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.290>
40. Sidaros SA, Omar RA, El-Kewey SA, El-Khalik SA. Virus elimination from infected garlic plants using different techniques. Egyptian J. Virol. 2004;1:333–341.
41. Ramírez-Malagón R, Pérez-Moreno L, Borodanenko A, Salinas-González GJ, Ochoa-Alejo N. Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2006;86(1):103-10. doi: <http://doi.org/10.1007/s11240-006-9102-6>
42. Hernandez R, Fontanella Y, Noa JC. Equipo y procedimiento de electroterapia para el saneamiento a virus en ajo (*Allium sativum* L.). Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Palacio de las Convenciones; 23-27 Junio de 1997. 1997;
43. Castro YI, Pérez RH, Noa-Carrazana JC, Pichardo T. Saneamiento al complejo viral del ajo (*Allium sativum* L.) mediante termoterapia y cultivo de meristemas. Cuadernos de fitopatología: Revista técnica de fitopatología y entomología. 1995;12(47):194-5. Available in: <https://diainet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=110011>
44. Soliman AM, Mahmoud SYM, Dawood RA. Molecular characterization of onion yellow dwarf virus (garlic isolate) with production of virus-free plantlets. International Journal of Virology. 2012;8(1):61-70. DOI: <http://doi.org/10.3923/ijv.2012.61.70>
45. CONCI VC. Virus de ajo, diagnóstico y obtención de plantas libres. Agro de Cuyo, Jornadas.(1): 59-60, 1991. 1991;
46. Nam M, Lee Y-H, Park CY, Lee M-A, Bae Y-S, Lim S, et al. Development of Multiplex RT-PCR for Simultaneous Detection of Garlic Viruses and the Incidence of Garlic Viral Disease in Garlic Genetic Resources. The Plant Pathology Journal. 2015;31(1):90-6. doi: <http://doi.org/10.5423/PPJ.NT.10.2014.0114>
47. Walkey DGA, Webb MJW, Bolland CJ, Miller A. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. Journal of Horticultural Science. 1987;62(2):211-20. doi: <http://doi.org/10.1080/14620316.1987.11515771>
48. Smékalová K, Stavlíková H, Dušek K. Distribution of viruses in the garlic germplasm collection of the Czech Republic. Journal of Plant Pathology. 2010;92(1):273-4. doi: <http://doi.org/10.4454/jpp.v92i1.43>
49. Bhojwani SS, Dantu PK. Micropropagation. En: Bhojwani SS, Dantu PK, editores. Plant Tissue Culture: An Introductory Text [Internet]. India: Springer; 2013 [citado 29 de marzo de 2021]. p. 245-74. doi: http://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9_17
50. Moriconi DN, Conci VC, Nome SF. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. Phytón, Buenos Aires. 1990;51(2):145-51. Available in: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19916775507>
51. Pardo A, Luna F, Hernández N. Regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. Bioagro. 2011;23(3):207-14. Available in: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1316-33612011000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
52. Monrroy Quispe VH. Efecto de la variación de medios y concentraciones de sacarosa en la multiplicación de microbulbificación *in vitro* de dos ecotipos de ajo (*Allium sativum* L.) para la obtención de semilla de alta calidad. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz (Bolivia). Facultad de Agronomía.; 2009. Available in: <http://hdl.handle.net/123456789/4894>
53. García-Rodríguez OG, Pérez-Moreno L, Navarro-León MJ, Salas-Araiza MD, Martínez-Jaime OA, León-Galván MF, et al. Virus fitopatógenos en insectos asociados al ajo. Revista Chapingo. Serie horticultura. 2014;20(2):147-56. doi: <http://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.10.057>
54. Fortiz EL. Transformación genética de ajo (*Allium sativum* L.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*. 2009; Available in: <https://docplayer.es/26467271-Transformacion-genetica-de-ajo-allium-sativum-l-mediante-agrobacterium-tumefaciens.html>
55. Donoso-Huaral IEEA. Producción de semilla de ajo, empleando la técnica de micropropagación en el Perú. 2013; Available in: <http://162.248.52.172:8080/jspui/handle/inia/506>

56. Tyagi RK, Agrawal A, Mahalakshmi C, Hussain Z, Tyagi H. Low-cost media for *in vitro* conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *in vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2007;43(1):51-8. doi: <http://doi.org/10.1007/s11627-006-9000-y>
57. Kamenetsky R, Rabinowitch HD. The genus *Allium*: A developmental and horticultural analysis. Horticultural reviews-westport then New York-. 2006;32:329. Available in: <https://doi.org/10.1002/9780470767986.ch7>
58. Abdul Nasim S, Mujib A, Kapoor R, Fatima S, Junaid A. Somatic embryogenesis in *Allium sativum* L.(cv. Yamuna Safed 3): Improving embryo maturation and germination with PGRs and carbohydrates. En: Anales de biología. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones; 2010. Available in: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113218269>
59. Pardo A, Hernández A, Méndez N. Caracterización molecular de siete clones de ajo (*Allium sativum* L.) mediante la técnica rapd. *Bioagro*. 2009;21(2):81-6. Available in: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1316-33612009000200001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
60. Benson EE, Johnston J, Muthusamy J, Harding K. Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant Cryopreservation. En: Gupta SD, Ibaraki Y, editores. Plant tissue culture engineering [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2008 [citado 29 de marzo de 2021]. p. 441-76. (Focus on Biotechnology). doi: http://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_24
61. García-Águila L, Fera M de, Acosta K. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Biotecnología Vegetal* [Internet]. 2007 [citado 29 de marzo de 2021];7(2). Available in: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/359>
62. Pardo A, Rivero S, Alvarado G. Conservación *in vitro* de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.). *Bioagro*. 2014;26(2):115–122. Available in: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-3361201400020006&lng=es&nrm=iso
63. Torres M de los A, Font A, López MR, Rodríguez AJ, Capote A, Llorente O. Conservación de semilla de ajo por métodos biotecnológicos. Available in: <https://www.grupoagricoladecuba.gag.cu/media/Agrotecnia/pdf/2007/Revista2/28.pdf>
64. Makowska Z, Keller J, Engelmann F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. *Cryo-Letters*. 1999;20(3):175-82. Available in: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010018253>
65. El-Gizawy AM, Ford-Lloyd BV. An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1987;9(2):147-50. doi: <http://doi.org/10.1007/BF00044250>
66. Castelar I. Crioconservación de recursos fitogenéticos en la red de bancos y colecciones de germoplasma de INTA. Available in: https://www.researchgate.net/publication/260122882_Crioconservacion_de_Recursos_Fitogeneticos_en_la_Red_de_Bancos_y_Colecciones_de_Germoplasma_de_INTA_-_Argentina
67. Mroginski L, Rey H, Dolce N, Scocchi A, Clausen A, Luna C, *et al.* Estado actual de las investigaciones sobre crioconservación de germoplasma vegetal en la Argentina. En *América Latina y el Caribe*. :53.
68. Al-Zahim M.A., Ford-Lloyd B.V., Newbury H.J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*. 1999;18(6):473–477. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002990050606>
69. Dolezel J, Novák F.J. Cytogenetic effect of plant tissue culture medium with certain growth substances on *Allium sativum* L. meristem root tip cells. *Biologia Plantarum*. 1984;26(4):293-8. doi: <http://doi.org/10.1007/BF02902911>
70. Saxena PN, Chauhan LKS, Gupta SK. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum* L.: Spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*. 2005;216(2):244-52. doi: <http://doi.org/10.1016/j.tox.2005.08.008>
71. Croci CA, Argüello JA, Curvetto NR, Orioli GA. Changes in peroxidases associated with radiation-induced sprout inhibition in garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Radiation Biology*. 1991;59(2):551-7. doi: <http://doi.org/10.1080/09553009114550481>
72. Izquierdo-Oviedo H, Disotuar R, González MC, González SJ. Micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.) and determination of the genetic stability of the plantlets obtained by AFLP markers. *Biotecnología Aplicada*. 2017;33(4):4211-8. Available in: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=73723>
73. Longo FUR, Monterroso LGM. Diversidad genética de poblaciones de ajo (*Allium sativum* L.) cultivadas en Guatemala, definida por marcadores de ADN. *Agronomía Mesoamericana*. 2007;18(1):85-92. Available in: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5039991>
74. İpek M, İpek A, Simon PW. Rapid Characterization of garlic clones with locus-specific DNA markers. *Turkish journal of agriculture and forestry*. 2008;32(5):357-62. Available in: <https://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/vol32/iss5/1/>