

**Producción *in vitro* de micro bulbos de ajo
(*Allium sativum*)**

Isanna Michel Victoriano Ynfante

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Producción *in vitro* de micro bulbos de ajo (*Allium sativum*)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Isanna Michel Victoriano Ynfante

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2016

Producción *in vitro* de micro bulbos de ajo (*Allium sativum*)

Isanna Michel Victoriano Ynfante

Resumen. El cultivo de ajo (*Allium sativum*) presenta un grave problema por el complejo viral natural que afecta el cultivo y su diseminación por la propagación mediante bulbillos. El objetivo del estudio fue la producción *in vitro* de micro bulbos de ajo. En el establecimiento se utilizaron domos meristemáticos apicales con dos primordios foliares en medio Murashige y Skoog modificado suplementado con reguladores de crecimiento. Se evaluaron los tratamientos 0.6AIB (0.6 mg/L de AIB), 0.2ANA+2.3BAP (0.2 mg/L de ANA + 2.3 mg/L de BAP), y Sin reguladores (sin reguladores). Los explantes establecidos pasaron a la etapa de multiplicación, se les eliminó las hojas y raíces, dejando un ápice caulinar de 2 cm. En la multiplicación: se evaluaron cinco tratamientos, 2*i*P+80SA+0.5ANA (2 mg/L de 2*i*P, 80 mg/L de sulfato de adenina + 0.5 mg/L de ANA), 2*i*P+0.5ANA (2 mg/L de 2*i*P + 0.5 mg/L de ANA), 5*i*P+0.1ANA (5 mg/L 2*i*P + 0.1 mg/L ANA), 0.1ANA+2BAP (0.1 mg/L ANA + 2 mg/L BAP) y 0.5*i*P+0.25ANA (0.5 mg/L 2*i*P + 0.25 mg/L ANA). Los resultados en el establecimiento demostraron que el mejor medio fue 0.6AIB con una altura de 9.86 cm, presencia de raíces en el 100% de las plantas y 78% de sobrevivencia. En la etapa de multiplicación, el medio 0.5*i*P+0.25ANA dio los mejores resultados de peso 0.35 g y diámetro 5.92 mm en promedio por micro bulbos.

Palabras clave: Auxinas, citoquininas, establecimiento, explante, multiplicación.

Summary. Garlic production (*Allium sativum*) presents a serious problem due to the natural complex that affects the crop which is usually spread by bulbils. The aim of the study is the *in vitro* production of garlic micro bulbs. Apical meristem domes with two leaf primordia domes were used for establishment using a modified Murashige and Skoog media. Three treatments were evaluated during establishment: 0.6AIB treatments (0.6 mg / L AIB), 0.2ANA+2.3BAP (0.2 mg / L NAA + 2.3 mg / L BAP), without growth regulator. Leaves and roots were removed from the established explants, leaving a 2 cm shoot apex. In the multiplication stage five treatments were evaluated: 2*i*P+80SA+0.5ANA(2 mg / L 2*i*P, 80 mg / L adenine sulfate and 0.5 mg / L NAA), 2*i*P+0.5ANA(2 mg / L 2*i*P and 0.5 mg / L ANA), 5*i*P+0.1ANA (5 mg / L 2*i*P + 0.1 mg / L ANA), 0.1ANA+2BAP (0.1 mg / L ANA + 2 mg / L BAP) and 0.5*i*P+0.25ANA (0.5 mg / L 2*i*P + 0.25 mg / L ANA). The results in the establishment showed that the best treatment was 0.6AIB with a height of 9.86 cm, presence of roots in 100% of plants and 78% survival. In the multiplication stage, the treatment that gave the best results was 0.5*i*P+0.25ANA with a weight and diameter of 0.35 g 5.92 mm on average per micro bulb.

Keywords: Auxins, cytokinins, establishment, explant, multiplication.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4 CONCLUSIONES.....	11
5 RECOMENDACIONES.....	12
6 LITERATURA CITADA.....	13

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) modificado para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemas de ajo.....	5
2. Reguladores de crecimiento suplementados al medio MS para el establecimiento <i>in vitro</i> de ajo.....	6
3. Reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo MS para el desarrollo <i>in vitro</i> de micro bulbos de ajo.....	7
4. Altura, presencia de raíces y sobrevivencia de los domos meristemáticos del ajo en respuesta a los medios MS modificados para el establecimiento <i>in vitro</i>	8
5. Peso y diámetro de micro bulbos de ajo <i>in vitro</i> como respuesta a los medios MS modificados	9

Figuras	Página
1. Ápice caulinar de ajo.....	3
2. Ápice caulinar y vista del corte transversal con sus hojas envolventes en centro el domo meristemático	4
3. Presencia de callos en el tratamiento 0.2ANA+2.3BAP a los 35 días de establecidos.....	9
4. Micro bulbos formados en el tratamiento 0.5iP+0.25ANA... ..	10

1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de ajo en los últimos años ha tenido una tendencia al alza, alcanzando en el 2013 una superficie de casi 1.5 millones de hectáreas cosechadas y una producción de 24.3 millones de toneladas (Flaño 2015). Esta creciente producción es por el aumento en su uso en la preparación de platillos, principalmente en la cocina mediterránea, en los últimos años en la cocina Mexicana, Centroamericana y Sudamericana; y al aumento en el poder adquisitivo de la India y China (Charles 2013).

En la producción de ajo se considera que uno de los insumos con más alto costo es la semilla que representa el 60% de los costos de producción, de ahí que los productores conserven las semillas de más alta calidad para la próxima siembra. La semilla en cualquier cultivo determina la calidad final del producto y si no se siembra semilla calidad, esto podría poner en riesgo toda la inversión subsiguiente (Terán 1990).

Uno de los mayores problemas al realizar una selección de semillas de cosechas anteriores es la alta incidencia de virus en este cultivo. Las infecciones virales en este cultivo ocasionan grandes pérdidas a cosecha. Las infecciones que se presentan pueden ser causadas por virus de los géneros Potyvirus, Carlavirus y Tospovirus. Por el tipo de propagación asexual del ajo, se han identificado complejos naturales de virus existentes los cuales se van multiplicando a medida que incrementa el uso de la semilla obtenidas de la cosecha anterior (Moreno et al. 2013).

El virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) perteneciente al género Potyvirus es el patógeno de mayor incidencia en el género de las *Allium* en el mundo. En el cultivo de ajo la transmisión de este virus se da principalmente por la semilla es uno de los más dañinos y temidos debido a que afecta el rendimiento y calidad de los bulbos reduciendo el peso y desarrollo de los dientes (Ramirez-Malagon et al. 2006).

La incidencia de Potyvirus es alta en la mayoría de cultivares de ajo. Las técnicas empleadas para la disminución o eliminación de este van desde termoterapia, quimioterapia y cultivo de tejidos; dando los mejores resultados este último con una eliminación de un 64% en la variedad de ajo Taiwán (Moreno et al. 2013).

Una alternativa para eliminar o disminuir la incidencia de virus es la utilización de plantas madres que estén libres de patógenos, esto se puede hacer por una selección estricta de las semillas obtenidas en la cosecha o mediante plántulas derivadas del cultivo de tejidos. Para asegurar que el material a utilizar esta libre de virus, se deben realizar análisis de laboratorio ya que muchos patógenos son asintomáticos (FAO 2013).

Una de las técnicas más empleadas para la producción de plantas élites libre de patógenos es el cultivo de tejidos utilizando explantes meristemáticos. A menudo las plantas de ajo conocidas como libres de virus son obtenidas con esta técnica (Giménez et al. 2016).

Los objetivos del estudio fueron:

- Evaluar tres medios de cultivo para el establecimiento de domos meristemáticos de ajo.
- Evaluar cinco medios en la fase de formación de micro bulbos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Material vegetal. El material vegetal fue extraído de bulbos de ajo, los que se separaron en bulbillos obteniendo en promedio 10 bulbillos por cada bulbo, a los cuales se les eliminó la envoltura protectora de los dientes dejando el ápice caulinar completo (Figura 1). Luego se extrajo el domo meristemático con dos primordios foliares de 2 mm aproximadamente.



Figura 1. Ápice caulinar de ajo [↔ 1 cm]

Desinfección del material vegetal. La desinfección del explante, consistió en un lavado con etanol al 70% por 30 segundos seguido por una inmersión en cloro comercial al 20% (NaOCl 4.72% de ingrediente activo) se agregó dos gotas de Tween80 por cada 100 ml de la solución desinfectante. Los bulbillos se sumergieron en la solución y se colocaron en la cámara de flujo laminar. Al cabo de 12 minutos se decantó la solución.

Extracción del domo meristemático. El explante utilizado fue el domo meristemo con dos primordios foliares de 2 mm de longitud aproximadamente. La extracción del explante se realizó con un bisturí No.21 dentro de la cámara de flujo laminar y usando el estereoscopio para una mejor observación. Con el bisturí se retiraron los primordios foliares dejando dos como protección del domo meristemáticos.

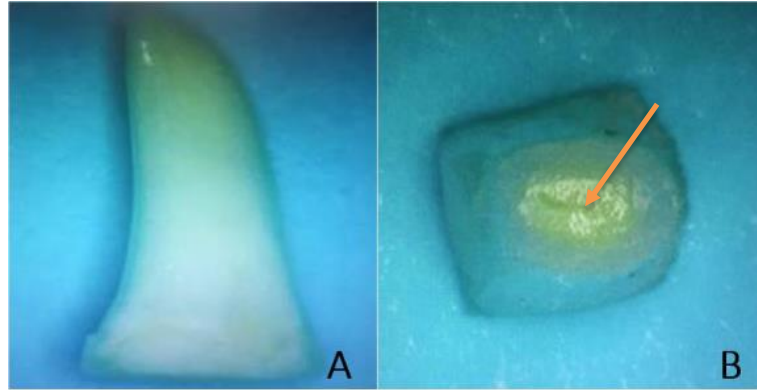


Figura 2. Ápice caulinar de ajo. A) Ápice caulinar B) Corte transversal del ápice caulinar con sus hojas envolventes en el centro el domo meristemático con primordios foliares señalado con una flecha.

Medio de cultivo para de establecimiento. Se usó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) modificado (Cuadro 1), suplementado con reguladores de crecimiento según el tratamiento.

Cuadro 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de ajo.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg L⁻¹
Macro- elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Micro- elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido	50.000
		Etilendiaminotetraacético	
Vitaminas		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.400
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.500
Carbohidrato		Sacarosa	30,000.000

Fuente: (Kyte 1987).

Tratamientos en la etapa de establecimiento. Para la fase de establecimiento se evaluaron tres tratamientos basados en el medio MS modificado y suplementados con reguladores de crecimiento siguiendo las recomendaciones de Carhuaricra et al. (2012), Ayabe y Sumi (1998) y Muhammad et al. (1997) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Reguladores de crecimiento suplementados al medio MS para el establecimiento *in vitro* de ajo.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg/L)	Autores
0.6AIB	0.6 de AIB	Carhuaricra et al. (2012)
Sin reguladores	Sin regulador	Ayabe y Sumi (1998)
0.2ANA+2.3BAP	0.2 de ANA + 2.3 de BAP	Muhammad et al. (1997)

Variables evaluadas. Al día 35 se evaluó, la presencia de raíces, altura de la planta, medida desde la raíz más desarrollada hasta el ápice de la planta y sobrevivencia. La sobrevivencia se estimó en porcentaje a partir de la cantidad de plantas que no presentaron desarrollo entre la cantidad total de plantas que se desarrollaron.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y 50 repeticiones, cada repetición representó una unidad observacional. Se realizó un análisis de varianza y una separación de medias con el método de Duncan, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Fase de desarrollo de micro bulbos. Después de seis semanas en el cuarto de crecimiento se extrajeron las *in vitro* plantas resultado de la fase de establecimiento, se eliminaron raíces y hojas más externas dejando un ápice caulinar de 2 cm. Los ápices caulinares fueron establecidos en cinco medios para el desarrollo del micro bulbo y se observaron durante 42 días.

Tratamientos en la etapa de fase de desarrollo de micro bulbos. En el experimento de desarrollo de micro bulbos se modificó el medio basal MS (Cuadro 1) suplementándolo con reguladores de crecimiento siguiendo las recomendaciones de Alvarado et al. (2001), Mujica et al. (2008), Lapitan et al. (1992), Seabrook (1993), Roksana et al. (2001) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo MS para el desarrollo *in vitro* de micro bulbos de ajo.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg/L)	Autores
2iP+80SA+0.5ANA	2 de 2iP + 80 de SA + 0.5 de ANA	Alvarado et al. (2001)
2iP+0.5ANA	2 de 2iP + 0.5 de ANA	Mujica et al. (2008)
5iP+0.1ANA	5 de 2iP + 0.1 de ANA	Lapitan et al. (1992)
2BAP+0.1ANA	2 de BAP + 0.1 de ANA	Seabrook (1993)
0.5iP+0.25ANA	0.5 de 2iP + 0.25 de ANA	Roksana et al. (2001)

Variables evaluadas. Al día 42 se midió, el diámetro del micro bulbo con un pie de rey digital y el peso del micro bulbo con una balanza analítica.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos y 30 repeticiones, cada repetición representando una unidad observacional. Se realizó un análisis de varianza y una separación de medias con el método de Duncan, con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento. El crecimiento de los domos meristemáticos se observó a partir del día dos después del establecimiento. En las variables altura de la planta y sobrevivencia, el tratamiento 0.6AIB dio los mejores resultados con 9.86 cm, 78% de sobrevivencia y el 100% de los explantes presentaron raíces (Cuadro 4). Este tratamiento fue el que presentó mejores resultados respecto a altura, esto debido probablemente a que mientras haya mayor relación auxinas-citoquininas habrá mayor estímulo al crecimiento de los tallos (Jordán y Casaretto 2006).

Cuadro 4. Altura, presencia de raíces y sobrevivencia de los domos meristemáticos del ajo en respuesta a los medios MS modificados para el establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	N	Altura (cm)	Explantes con raíces (%)	Sobrevivencia (%)
0.6AIB	50	9.8647 a	100 a [¥]	78 a
Sin reguladores	50	7.4659 b	79 b	65 b
0.2ANA+2.3BAP	50	4.3882 c	55 c	54 c

[¥] Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Los domos meristemáticos establecidos en el tratamiento Sin reguladores desarrollaron a pesar de que este medio no contenía reguladores de crecimiento, esto se puede atribuir a lo mencionado por Cárdenas (1995) de que las plantas son capaces de producir auxinas a partir de domos meristemáticos y después del desarrollo de las raíces estas son capaces de producir citoquininas, siendo estas hormonas las esenciales en las primeras etapas de desarrollo de las plantas. La cantidad de auxinas endógenas en los domos meristemáticos es alta por lo que no es necesario adicionarles al medio de cultivo (Carhuaricra et al. 2012).

Los domos meristemáticos establecidos en el tratamiento 0.2ANA+2.3BAP presentaron los peores resultados en cuanto a altura de la planta, esto se atribuye a la relación existente entre citoquininas y auxinas, teniendo en este tratamiento alta concentración de citoquininas en relación a las auxinas. Según Villanueva et al. (2013) El uso de BAP a una concentración mayor 1 mg/L podría estar relacionado con la disminución de la diferenciación celular y la inducción a callogénesis, esto explica que el 48% del total de los explantes establecidos en este tratamiento presenten callos.



Figura 3. Presencia de callos en el tratamiento 0.2ANA+2.3BAP a los 35 días de establecidos.

Formación de micro bulbos. El tratamiento 0.5iP+0.25ANA presentó los mejores resultados de peso y diámetro del micro bulbo 1.18 g y 10.52 mm (Cuadro 5). El tratamiento 2iP+80SA+0.5ANA presentó peso y diámetro promedio de 0.35 g y 5.92 mm siendo este el segundo mejor resultado, estos pudieran estar influenciados por el sulfato de adenina, que en forma individual o combinada con citoquininas y auxinas estimula la producción de raíces. Roca y Mroginski (1991) observaron formación de micro bulbos en el 100% de las *in vitro* plantas con sulfato de adenina en combinación con 2iP.

Cuadro 5. Peso y diámetro de micro bulbos de ajo *in vitro* como respuesta a los medios MS modificados.

Tratamiento	N	Peso (g)	Diámetro (mm)
2iP+80SA+0.5ANA	30	0.359 b [¥]	5.925 b
2iP+0.5ANA	30	0.216 bc	4.508 c
5iP+0.1ANA	30	0.300 bc	5.338 b
2BAP+0.1ANA	30	0.158 c	3.745 d
0.5iP+0.25ANA	30	1.180 a	10.524 a

[¥] Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Los ápices establecidos en los tratamientos $2iP+80SA+0.5ANA$, $2iP+0.5ANA$, $5iP+0.1ANA$ y $0.5iP+0.25ANA$ presentaron los mejores resultados de diámetro y peso de los micro bulbos comparados con el tratamiento que no se suplementó con $2iP$. Estos resultados coinciden con los de Carhuaricra et al. (2012) y Mujica et al. (2008) quienes tuvieron los mejores pesos y diámetros con el regulador $2iP$. El regulador $2iP$ tiene un efecto estimulador en la formación de órganos de almacenaje (Mujica et al. 2008).

En el tratamiento $2BAP+0.1ANA$ los resultados fueron iguales a los de Mujica et al. (2008). Los medios suplementados con BAP dieron los peores resultados en el desarrollo de micro bulbos.



Figura 4. Micro bulbos formados en el tratamiento $0.5iP+0.25ANA$. A) *Vitro* plántulas de ajo. B) Callo y mal formación en micro bulbo de ajo.

4. CONCLUSIONES

- Para el establecimiento de ajo el mejor medio es el de Carhuaricra et al. (2012) suplementado con 0.6 mg/L de AIB.
- El mejor medio para la fase de formación de micro bulbos es el de Roksana et al. (2001) suplementado con 0.5 mg/l 2 iP + 0.25 mg/L ANA.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el medio $0.5iP+0.25ANA$ hasta finalizar la micro propagación, para corroborar si llega al peso de 4 g por bulbillo de ajo, que es a partir de este peso donde se ha registrado la mejor calidad de las semillas.
- Evaluar mediante un diagnóstico patológico, si se logró regenerar plantas libres de virus.

6. LITERATURA CITADA

- Alvarado M, Garcia A, Martinez M. 2001. Obtención de semilla de ajo (*Allium sativum L.*) libre de patógenos. AP-UAGRO. [consultado 2016 Sep 1]; 5 (1) : 3-6. <http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/CD%20Jornadas%202000%20-%202001/Agropecuarias/PDF/ap02-002.pdf>
- Ayabe M, Sumi S. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum L.*). *Plant Cell reports*. 17 (10):773–779. DOI: 10.1007/s002990050481
- Cárdenas AML. 1995. Cultivo in vitro de brotes de ajo *Allium sativum L.* de tres variedades obtenidas en Marín, México [Tesis]; Universidad de Nuevo León-México. <http://eprints.uanl.mx/7449/1/1020112167.PDF>.
- Carhuaricra E, Olivera S, Gonzales A, Rodríguez L. 2012. Introducción y multiplicación in vitro del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. *Revista Peruana de Biología*. [consultado 2016 marz 11]; 19(3):341–344. <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/1051/868>
- Charles DJ, editor. 2013. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4614-4309-4.
- FAO. 2013. Material de propagación de calidad declarada: Protocolos y normas para cultivos propagados vegetativamente. Material de propagación de calidad declarada; [consultado 2016 agosto 8]. 195:57–65. <http://www.fao.org/3/a-i1195s.pdf>.
- Flaño A. 2015. Mercado del ajo; [consultado 2016 Jul 16]. http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1442431522ajo.pdf.
- Giménez MD, Yañez-Santos AM, Paz RC, Quiroga MP, Marfil CF, Conci VC, García-Lampasona SC. 2016. Assessment of genetic and epigenetic changes in virus-free garlic (*Allium sativum L.*) plants obtained by meristem culture followed by in vitro propagation. *Plant Cell reports*. [consultado 2016 Aug 8]; 35(1):129–141. <http://search.proquest.com/agriculturejournals/docview/1754488047/B5D36D4015664EA5PQ/13?accountid=149393>.
- Jordan M, Casaretto J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas: Efectos fisiológicos de las auxinas; [consultado 2016 Sep

18].7–8.<http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>.

- Kyte L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micropropagation. 3a ed. Portland,Oregon: Colorcraft. 239 p.
- Moreno L, Navarro M, Ramírez-Malagón R, Mendoza B, Núñez H, León M. 2013. Detencion de complejos virales por ELISA y confirmación por RT-PC. Interciencia. [consultado 2016 Jul 16]; 38(05):364–369. http://www.interciencia.org/v38_05/364.pdf.
- Muhammad S, Tomikichi W, Kazumi H. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. Plant Cell. (50):83–89. DOI: 10.1023/A:1005973929862
- Mujica H, Sanabria M, Mogollón N, Perozo Y. 2008. Formación in vitro del bulbo del ajo morado (*Allium sativum L.*). Revista de la Facultad de Agronomía. [consultado 2016,Aug14];25(2):197–210. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182008000200001
- Ramírez-Malagón R, Pérez-Moreno L, Borodanenko A, Salinas-González GJ, Ochoa-Alejo N. 2006. Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. Plant Cell Tiss Organ Cult. 86(1):103–110. DOI: 10.1007/s11240-006-9102-6
- Roca W, Mroginski M. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali (Colombia): CIAT; [consultado 2016 Sep 18]. https://books.google.hn/books?id=EXijYNw55DUC&dq=sulfato+de+adenina+en+produccion+in+vitro&hl=es&source=gbs_navlinks_s.
- Roksana R, Alam M, Islam R, Hossain M. 2001. In vitro Bulblet Formation from Shoot Apex in Garlic (*Allium sativum L.*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. [consultado2016Sep06];12:11–17. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.522.8227&rep=rep1&type=pdf>
- SAS. 2014. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc. Cary N.C.
- Seabrook J. 1993. In vitro propagation and bulb formation of garlic. Agriculture Canada. [consultado2016Jul22];4:155-158. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/cjps94-033>
- Terán O. 1990. El cultivo de ajo: Semilla. 1ª ed. Bolivia: Centro de Información para el Desarrollo.59p.https://books.google.hn/books?id=SO9JlmT_chEC&pg=PA13&dq=produccion+de+ajo&hl=en&sa=X&redir_esc=y.

- Lapitan V, Pateña L, Rosario L. 1991. "In vitro system of producing shallot (*Allium cepa* var group *aggregatum*) planting materials". 7th Annual Scientific Conference of FCSSP, Bureau of Soils and Water Management, Diliman, Quezon, City, November 7-9. <http://agris.fao.org/aos/records/PH9510713?output=xml>
- Villanueva F, Mansilla A, Abades S, Cáceres J. 2013. Efecto de auxinas y citoquininas en el cultivo de tejido de *Ahnfeltia plicata* (hudson) fries, 1836 (ahnfeltiales, rhodophyta) de la región de Magallanes. Anales Instituto Patagonia. [Consultado 2016 Sep 18];41(1).http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-686X2013000100009&lang=pt.