

DESINFECCIÓN PARA EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE CEBOLLA OCAÑERA ALLIUM CEPA L

DISINFECTION FOR THE ESTABLISHMENT IN VITRO OF OCAÑA ALLIUM CEPA L ONION

Biólogo. Jose Arnoldo Granadillo Cuello^a, MSc. Elibardo Pacheco Carrascal^b

^a Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, Grupo de investigación GI@DS
Via Acolsure, Sede el Algodonal, Ocaña, Colombia, jagranadillo@ufpso.edu.co

^b Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, Grupo de investigación GI@DS
Via Acolsure, Sede el Algodonal, Ocaña, Colombia, epcarrascal@ufpso.edu.co

Fecha de recepción: 12-09-2014

Fecha de aprobación: 29-11-2014

Resumen: La Cebolla Ocañera Allium cepa L. se caracteriza por su siembra asexual (bulbos), a diferencia de variedades sembradas a partir de semilla sexual. En este tipo de siembra se fomentan problemas fitosanitarios, haciendo que los cultivadores apliquen plaguicidas periódicamente, elevando los costos de producción, reduciendo notablemente los rendimientos del cultivo y generando crisis económica en la región. Se han estudiado métodos de propagación mediante el cultivo de tejido in-vitro, el cual permite la regeneración de plantas de un genotipo deseable en condiciones asépticas para liberarlas de enfermedades. El objetivo de esta investigación fue estandarizar un protocolo de desinfección para establecer plántulas in-vitro de cebolla ocañera, bajando los niveles de contaminación con bacterias, virus y hongos. El diseño experimental fue completamente al azar, con una variedad de cebolla Red creole y cuatro tratamientos de desinfección. Los meristemos fueron inoculados en medio de cultivo de establecimiento. La variable analizada fue el número de explantes contaminados a los 4, 8 y 12 días del establecimiento. El índice más bajo de contaminación fue del 12% en el tratamiento D, el cual se mantuvo hasta después de los 12 días del establecimiento.

Palabras clave: Bacteriosis, establecimiento, fusariosis, in vitro, micropropagación, virosis..

Abstract: Ocaña allium cepal onion is characterized for its asexual sowing (bulbs), unlike to varieties sown from sexual seeds. In this type of sowing phytosanitary problems are fomented, causing that the farmers apply pesticides periodically, increasing the production costs, notably decreasing the performance of the crop and creating economic crisis in the region. It has been studied propagation methods through the sowing of in vitro tissue, which allows plants regeneration from a desirable genotype in aseptic conditions in order to release them from diseases. The objective of this research was to standardize a disinfection protocol in order to

establish in vitro seedlings from Ocaña onion, lowering the contamination levels with bacterias, viruses and funguses. The experimental design was completely random, with an onion variety red creole and four disinfection treatments. The meristems were inoculated in the middle of establishment crops. The analyzed variable was the number of contaminated explants at 4,8 and twelve years from establishment. The lowest index from contamination was of 12% in the D treatment, which was maintained until after twelve days after the establishment.

Keywords: Bacteriosis, establishment, fusariosis, in vitro, micropropagation, virusis.

1. INTRODUCCIÓN

La cebolla se produce en 175 países alrededor del mundo con más de 3,7 millones de hectáreas sembradas y más de 70 millones de toneladas, cifra alcanzada en el 2007 (Recabarren, 2010). Es una hortaliza que se ha adaptado a una gran variedad de climas. La producción mundial se concentra en Asia con más del 48% y el país dominante es China con el 30% (Recabarren 2010). En Suramérica uno de los principales productores es Perú que alcanzó en 2008 un área cultivada de más de 18 mil hectáreas y una producción de 700 mil toneladas (UE PERU/PENX 2003 – 2013). El principal mercado de la cebolla peruana es Estados Unidos, aunque a partir del 2009 en Colombia su importación ha crecido un 108,3%.

En Colombia, se siembran 13 mil hectáreas de cebolla aproximadamente y se pretende que el área sembrada aumente a 35 mil hectáreas para el año 2020 (Quintero y Moreno, 2013). En el segundo semestre de 2006, la producción de cebolla de bulbo a nivel nacional estuvo concentrada en los departamentos de Boyacá con 5370 ha cosechadas, Cundinamarca con 5090, Norte de Santander con 4165 y otros departamentos con 814, para un total de 15.439 cosechadas (ENA, 2006). Las principales variedades cultivadas fueron: Henry's special f1, Yellow granex 1 (PRR), Nirvana f1, Caramelo f1, Sweet carolinne f1, Superex f1, Azteca, Colina f1, Don

Víctor f1, White creole. En el departamento de Norte de Santander de las variedades de cebolla roja ocañera se sembraron: Hibrido rojo f1, Rosada milenio f1, Burguesa f1, Común y red creole (ENA, 2006).

En el segundo semestre de 2011 la producción de cebolla de bulbo estuvo concentrada en Boyacá con 2988 ha cosechadas, Cundinamarca con 2263 ha cosechadas, Norte de Santander con 871 ha cosechadas y otros departamentos con 776 ha cosechadas (ENA, 2011). Es decir la producción de cebolla disminuyó entre 2006 y 2011 a nivel nacional un 51,1%, y en el departamento de Norte de Santander un 81,36%.

En el departamento de Norte de Santander, la provincia de Ocaña, ocupa un lugar importante en la producción de cebolla de bulbo *Allium cepa* L., conocida como cebolla ocañera, seguida por la producción de tomate, frijol, tabaco, caña panelera y café (Quintero y Moreno, 2013). La producción de cebolla ocañera en la región se concentra en los municipios de La playa de Belén, Abrego, Ocaña, El Carmen, San Calixto y Hacarí (Vergel et al, 2003), aunque en dos municipios del Sur de Cesar muy cercanos a la provincia, Rio de Oro y Gonzales este cultivo es representativo y sus producciones se comercializan en el municipio de Ocaña y Abrego.

La cebolla de bulbo variedad ocañera es una planta perteneciente a la familia Liliáceae

con follaje color verde claro, que produce de 1 a 10 bulbos de color rojo o rosado, de diámetro entre 3,5 y 6 cm. Esta planta florece en invierno, sin embargo sus flores no producen semilla. Se desarrolla entre los 1200 y los 1900 m.s.n.m., a una temperatura promedio de 20 °C y una humedad relativa promedio de 78% (Vergel et al, 2003).

En Colombia los cultivos de cebolla tienen los mismos problemas tecnológicos y de comercialización. Ya sea en Boyacá, Cundinamarca o Norte de Santander, predomina la baja sostenibilidad y competitividad (Pinzón, 2009). Una de las causas ha sido el incremento de enfermedades fitosanitarias como la raíz rosada *Pirenochaeta terrestris*, fusariosis *Fusarium* sp, bacteriosis producida por *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xantomonas*, mancha parda *Alternaria porri*, quemazón o hielto *Peronospora destructor*, entre otras. Además en Colombia no existen técnicas, la organización o las políticas para la producción adecuada de bulbos base para la propagación vegetativa de cebolla común, por lo que los agricultores utilizan un insumo de baja calidad sanitaria y agronómica y que generalmente son producidos por ellos mismos, dándose un efecto multiplicador de las enfermedades que han infectado a sus cultivos.

Una semilla de mala calidad y las enfermedades han desplazado el cultivo de la cebolla ocañera a otras zonas dándose un fraccionamiento de la producción y una ampliación del radio de infección (Pinzón, 2009). Otro problema no menos importante es el almacenamiento de los bulbos, puesto que estos no se curan ni se someten a procesos de selección y clasificación lo cual le resta valor agregado y competitividad al cultivo.

A pesar de que el Ministerio de Agricultura se ha fijado como meta duplicar la

producción de cebolla ocañera para el 2020 y que la provincia de Ocaña tiene el potencial para cumplir con esta demanda, se debe hacer una reconversión tecnológica para aumentar la productividad y disminuir la incidencia de enfermedades para poder estar al nivel de países como Ecuador cuyo principal mercado es Colombia con lo cual nos ha generado pérdidas significativas (Quintero y Moreno, 2013).

Las técnicas de cultivo de tejido se han contemplado como herramientas para limpiar de microorganismos diferentes materiales vegetales como la yuca, el plátano, y propagar masivamente especies que tienen problemas de producción de semillas y reproductivos. Además han sido utilizadas para la regeneración in vitro de cebolla (Sierra, 2005), utilizando cultivo de callos (Dunstan y Short, 1978), embriones maduros (Van del valk et al, 1992), disco basal y yemas (Rodríguez et al, 1997), cultivo de flor y ovarios (Kamstaityte y Stanys, 2002). Aunque en cebolla no se han realizado estudios de evaluación de métodos de desinfección, existen trabajos de desinfección ex vitro de cebolla en rama donde se ha usado hipoclorito de sodio al 1,5% de 10 a 15 minutos, jabón detergente yodado al 1% durante 10 minutos, fungicida ditiocarbamato al 0,3% 15 minutos, obteniendo bajos porcentajes de infección y ayudando a los campesinos que viven de este producto (Gómez, 2003). Watson et al 2011, utilizaron agua destilada y jabón, solución Zetaran® (fungicida) y de Agri-mycin® (bactericida y fungicida), hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5%, para desinfectar explantes de cebolla y ajo.

2. METODOLOGÍA

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad

Francisco de Paula Santander Ocaña donde se cuenta con los equipos e instalaciones para hacer Micropropagación clonal in vitro de especies vegetales. El material vegetativo utilizado fue el Red creole, tomado de las zonas de cultivo en el municipio de La playa de Belén en el departamento de Norte de Santander. Para esto se tuvo en cuenta la disponibilidad del material vegetal, tamaño, capacidad de producción, adaptabilidad al medio, su variedad, su limpieza de hongos, bacterias o virus.

Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue completamente al azar, con una variedad de cebolla Red creole y cuatro tratamientos de desinfección. La unidad experimental fue 40 explantes. Inicialmente se tomaron 20 bulbos de cebolla ocañera que se sometieron a diferentes tratamientos de desinfección A, B, C, D, con 10 repeticiones cada uno y se realizaron 9 réplicas (Tabla 1; Figura 1). A los bulbos se le retiraron las catafilas progresivamente hasta que se obtuvo el meristemo presente en las yemas laterales, se sacaron dos yemas por bulbo para un total de 40 meristemos aislados y desinfectados por réplica. Finalmente los meristemos fueron inoculados en medio de cultivo de establecimiento MS+ 2mg/L⁻¹ de BAP (Figura 2). La variable analizada fue el número de explantes contaminados a los 4, 8 y 12 días del establecimiento. Los resultados se analizaron mediante la aplicación de estadística univariada y de la ANOVA de una vía.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección utilizados durante el ensayo.

TRATAMIENTO A	TRATAMIENTO B
1. Remoción de escamas secas y enjuague en agua corriente 1 hora 2. Remoción de catafilas e inmersión en detergente comercial 1 hora 3. Remoción de catafilas e inmersión en hipoclorito de sodio al 0,5% 2,5% 5%; 10, 5 y 5 minutos respectivamente 4. Reposo en alcohol 70% hasta el establecimiento	1. Lavar con isodine 2. Lavar con hipoclorito al 2% durante 10 minutos 3. Lavar con hipoclorito al 2% 5 minutos en cabina de flujo laminar 4. Enjuagar con agua estéril 10 minutos
TRATAMIENTO C	TRATAMIENTO D

1. Lavado con agua y jabón 5 minutos 2. Lavado con agua destilada 5 minutos 3. Lavado con hipoclorito de sodio 0,5% 5 minutos 4. Lavado con agua destilada 5 minutos 5. Lavado con hipoclorito de sodio 5% 5 minutos 6. Lavado con agua destilada 5 minutos	1. Lavado en agua corriente 3 horas, luego quitar catafilas 2. Lavado en agua con detergente en polvo comercial 3 horas, con agitación periódica, luego quitar catafilas 3. Inmersión en fungicida 3 horas, luego quitar catafilas 4. Tres lavados con agua destilada, luego quitar catafilas 5. Lavado en cabina de flujo laminar con hipoclorito al 0,5%, 2,5% y 5%, 10, 5 y 5 minutos respectivamente, luego quitar catafilas 6. Lavado y reposos en agua destilada hasta el establecimiento
--	--

Fuente: Autores



Figura 1. Proceso de desinfección de los explantes de cebolla.
 Fuente: Autores



Figura 2. Desarrollo de los explantes de cebolla después de su establecimiento.

Fuente: Autores

3. RESULTADOS

A los cuatro días del establecimiento se observó un promedio de explantes

contaminados de 1,8; 4,9; 8,6 y 1,1 para los tratamientos A, B, C y D respectivamente, correspondientes al 18, 49, 86 y 11 % de contaminación (Tabla 2; figura 3). Igualmente a los ocho días del establecimiento se observó contaminación a razón de 2,6; 6,3; 9,7 y 1,2 explantes contaminados para los tratamientos A, B, C y D respectivamente, correspondientes al 26, 63, 97 y 12 % de contaminación (Tabla 3; figura 4). A lo doce días del establecimiento se observaron 2,6; 6,3; 10 y 1,2 explantes contaminados para cada tratamiento respectivamente y correspondientes al 26, 63, 100 y 12 % de contaminación (Tabla 4; Figura 5).

Tabla 2. Número de explantes contaminados por tratamiento a los ocho días del establecimiento.

	TA	TB	TC	TD
EXPERIMENTO	2	5	8	1
R1	1	5	10	2
R2	2	4	8	1
R3	2	5	8	1
R4	1	6	9	1
R5	2	5	9	1
R6	2	5	8	1
R7	2	4	8	1
R8	2	5	8	1
R9	2	5	10	1

Fuente: Autores.

Tabla 3. Número de explantes contaminados por tratamiento a los cuatro días del establecimiento.

	TA	TB	TC	TD
EXPERIMENTO	4	6	10	1
R1	2	6	10	2
R2	3	6	10	1
R3	2	7	9	1
R4	3	6	10	2
R5	2	6	10	1
R6	2	7	10	1
R7	3	5	9	1
R8	2	7	9	1
R9	3	7	10	1

Tabla 4. Número de explantes contaminados por tratamiento a los ocho días del establecimiento. Fuente: Autores

	TA	TB	TC	TD
EXPERIMENTO	4	6	10	1
R1	2	6	10	2
R2	3	6	10	1
R3	2	7	10	1
R4	3	6	10	2
R5	2	6	10	1
R6	2	7	10	1
R7	3	5	10	1
R8	2	7	10	1
R9	3	7	10	1

Fuente: Autores.

El número de explantes contaminados fue menor en el tratamiento D seguido por el tratamiento A, sin embargo el proceso de desinfección no tuvo éxito en algunos explantes lo cual nos hace pensar que otros factores influyen en su contaminación como la edad y el estado de avance de contaminación de la planta madre.

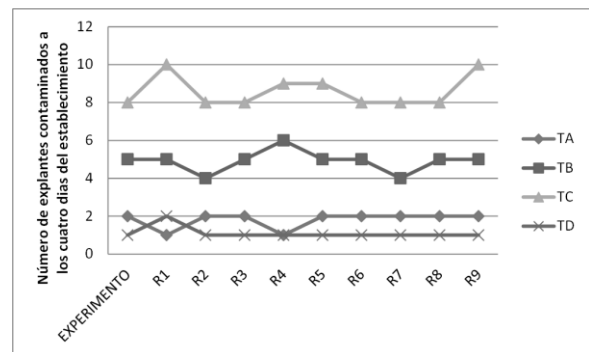


Figura 3. Número de explantes contaminados a los cuatro días del establecimiento.

Fuente: Autores

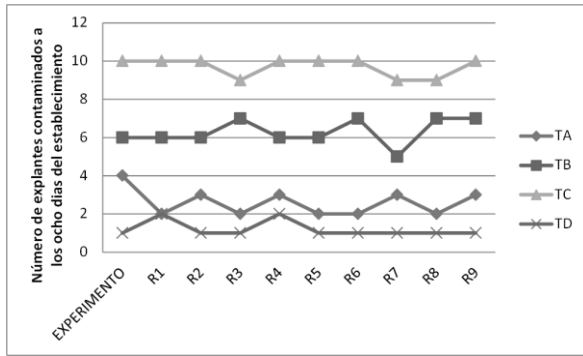


Figura 4. Número de explantes contaminados a los ocho días del establecimiento.

Fuente: Autores

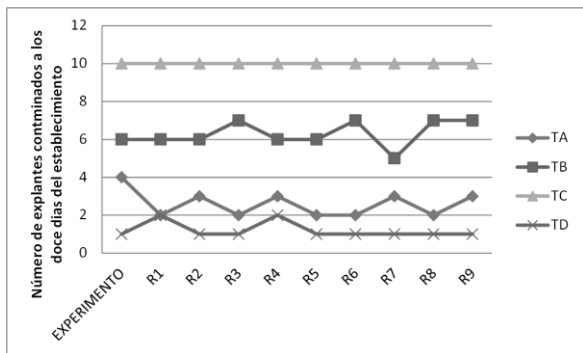


Figura 5. Número de explantes contaminados a los doce días del establecimiento.

Fuente: Autores

En las observaciones realizadas entre el octavo y decimosegundo día se notó que la cantidad de explantes contaminados no aumentó, de esto podemos inferir que los agentes contaminantes estaban presentes en el material vegetativo seleccionado y no fueron adquiridos por error en su manipulación, en la preparación de los medios de cultivo o en la técnica empleada para el establecimiento. El análisis de varianza calculado para los datos del experimento y sus réplicas a los cuatro días del establecimiento se puede observar en la tabla 5, 6 y 7.

Tabla 5. ANOVA obtenida a los cuatro días del establecimiento.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	351,800	117,267	357,76	0,000
Error	36	11,800	0,328		
Total	39	363,600			

S = 0,5725 R-cuad. = 96,75% R-cuad.(ajustado) = 96,48%

Fuente: Autores

Tabla 6. ANOVA obtenida a los ocho días del establecimiento.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	439,700	146,567	432,49	0,000
Error	36	12,200	0,339		
Total	39	451,900			

S = 0,5821 R-cuad. = 97,30% R-cuad.(ajustado) = 97,08%

Fuente: Autores

Tabla 7. ANOVA obtenida a los doce días del establecimiento.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Factor	3	468,875	156,292	557,08	0,000
Error	36	10,100	0,281		
Total	39	478,975			

S = 0,5297 R-cuad. = 97,89% R-cuad.(ajustado) = 97,72%

Fuente: Autores

En las Tablas se muestran los datos correspondientes a los cuatro, ocho y doce días después del establecimiento de los explantes de cebolla, el *p* valor está por debajo de 0,05 en cada una de ellas, lo que indica que hay diferencia significativa entre los tratamientos, y que algunos de estos tienen un mejor efecto en la desinfección de los explantes provenientes de campo, por esto la diferencia de limpieza entre los explantes se debe a los tratamientos y no al error experimental. El índice de ajuste (R^2) está entre 96,75% y 97,89%, indicando una estrecha relación entre las variables y unos datos ajustados al modelo.

Tabla 8. Análisis de las medias, basados en la desviación estándar agrupada, con un índice de confianza del 95%. Datos obtenidos a los cuatro días del establecimiento.

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv. Est. agrupada					
Nivel	N	Media	Desv. Est.	-----+-----+-----+-----+	
A	10	1,8000	0,4216	(*-)	
B	10	4,9000	0,5676		(*-)
C	10	8,6000	0,8433		(*-)
D	10	1,1000	0,3162	(*-)	
				-----+-----+-----+-----+	
				2,5	5,0
				7,5	
10,0					
Desv. Est. agrupada = 0,5725					

Tabla 9. Análisis de las medias basados en la desviación estándar agrupada, con un índice de confianza del 95%. Datos obtenidos a los ocho días del establecimiento.

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada					
Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+	
A	10	2,600	0,699	(*-)	
B	10	6,300	0,675		(*-)
C	10	9,700	0,483		(-*)
D	10	1,200	0,422	(-*)	
				-----+-----+-----+-----+	
				2,5	5,0
				7,5	
10,0					
Desv.Est. agrupada = 0,582					

Fuente: Autores.

Tabla 10. Análisis de las medias basados en la desviación estándar agrupada, con un índice de confianza del 95%. Datos obtenidos a los doce días del establecimiento.

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada					
Nivel	N	Media	Desv.Est.	-----+-----+-----+-----+	
A	10	2,600	0,699	(*-)	
B	10	6,300	0,675		(*-)
C	10	10,000	0,000		
D	10	1,200	0,422	(-*)	
				-----+-----+-----+-----+	
				2,5	5,0
				7,5	
10,0					
Desv.Est. agrupada = 0,530					

Fuente: Autores.

En la tabla 8, 9 y 10, se observa que el tratamiento D tuvo un porcentaje de éxito mayor al obtener una media de infección más baja (1,1 – 1,2), seguido por el tratamiento A (1,8 – 2,6). Esto quiere decir que el tratamiento D bajo las condiciones de laboratorio es el más adecuado para la desinfección de los explantes de cebolla. En los cálculos estadísticos básicos consignados en las tablas 11, 12 y 13 podemos observar que los coeficientes de variación tienen un comportamiento particular para este experimento, entre mas explantes estén contaminados y se acerquen a N= 10, el coeficiente de variación se hace menor hasta llegar a 0 como sucede en el tratamiento C el cual muestra los coeficientes de variación más bajos pero las medias de infección más altas. Por el contrario para los tratamientos D y A las medias de infección son bajas pero los coeficientes de variación son altos.

Tabla 11. Datos estadísticos básicos obtenidos a los cuatro días del establecimiento.

Variable	N	N*	Media del Error			
			Media	estándar	Desv.Est.	Varianza
Mínimo	10	0	1,800	0,133	0,422	0,178
Q1	1,000	1,750				
A	10	0	4,900	0,180	0,568	0,322
B	10	0	4,750			
C	10	0	8,600	0,267	0,843	0,711
8,000	8,000					
D	10	0	1,100	0,100	0,316	0,100
1,000	1,000					

Fuente: Autores.

Tabla 12. Datos estadísticos básicos obtenidos a los ocho días del establecimiento.

Variable	N	N*	Media del Error			
			Media	estándar	Desv.Est.	Varianza
Mínimo	10	0	2,600	0,221	0,699	0,489
Q1	2,000	2,000				
A	10	0	6,300	0,213	0,675	0,456
B	10	0	6,000			
C	10	0	9,700	0,153	0,483	0,233
9,000	9,000					
D	10	0	1,200	0,133	0,422	0,178
1,000	1,000					

Fuente: Autores.

Tabla 13. Datos estadísticos básicos obtenidos a los doce días del establecimiento.

Variable	N	N*	Media del Error			
			Media	estándar	Desv.Est.	Varianza
A	10	0	2,600	0,221	0,699	0,489
2,000	2,000					
B	10	0	6,300	0,213	0,675	0,456
5,000	6,000					
C	10	0	10,000	0,000	0,000	0,000
10,000	10,000					
D	10	0	1,200	0,133	0,422	0,178
1,000	1,000					

Fuente: Autores.

4. CONCLUSIONES

Los explantes tomados directamente de campo y sin un método de selección rigurosa pueden presentar niveles de infección altos, lo que altera el proceso de establecimiento debido a que los métodos de desinfección pueden no ser efectivos, por esto es necesario ensayar métodos para diferentes especies dependiendo su estado fitosanitario. En esta investigación el método más eficaz para desinfectar explantes de cebolla provenientes de campo es el correspondiente al tratamiento D que aseguró un porcentaje de infección máximo del 12%, sin embargo el tratamiento A también aseguró niveles bajos de infección, pero para el establecimiento in vitro se deben utilizar metodologías que aseguren el mínimo de pérdidas por contaminación.

5. FINANCIACIÓN

Agradecemos a la División de Investigación y Extensión de la Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña por su apoyo administrativo y económico. A el laboratorio de Biotecnología Vegetal, por poner a disposición del proyecto toda su infraestructura y personal.

6. BIBLIOGRAFÍA

Dunstan, D. I., and K. C. Short. (1978). Shoot production from onion callus tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 9: 99-110.

Encuesta Nacional Agropecuaria, ENA (2006). Sistema de información de la oferta Agropecuaria.

Encuesta Nacional Agropecuaria, ENA (2011). Sistema de información de la oferta Agropecuaria.

Gómez Hurtado, J. E. (2003). Propagación de semilla de cebolla de rama libre de nematodo (*Ditylenchus dipsaci*) mediante la técnica de propagación ex vitro.

Kamstaityte, D., and V. Stanys. (2002). Pathways of onion regeneration via flower and ovary culture. *Zemdirbyste, Mokslo Darbai* 78: 245-250.

Pinzón, R. (2009). Los cultivos de cebolla y ajo en Colombia: estado del arte y perspectivas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(1).

Proyecto de cooperación UE-PERÚ en materia de asistencia técnica relativa al comercio. Apoyo al programa estratégico nacional de exportaciones (PENX 2003 – 2013). Asistencia técnica para los planes operativos de producto.

- Quintero T, B., & Moreno, D. C. (2013). Caracterización socioeconómica de la población asentada en la cuenca hidrográfica del río algodonál, Norte de Santander. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Santander. Colombia. 121 p.
- Recabarren, P. E. (2010). Mercado Agropecuario: Situación del mercado de la cebolla 2009 - 2010. ODEPA-Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Gobierno de Chile-Ministerio de Agricultura.
- Rodríguez, B. M., J. E. Pinto y C. M. Souza (1997). In vitro propagation of onion (*Allium cepa*) from bulb tissues. *Ciencia y Agrotecnología*. 21: 343 – 352.
- Sierra, M. E. Q., Paz, A. R., Varela, A. S., Espinosa, M. A. G., Castañeda, G. C., & Ponce, J. L. C. (2005). Regeneración in vitro de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agrociencia*, 39(6), 647-655.
- Van der Valk, P., Scholten, O. E., Verstappen, F., Jansen, R. C., & Dons, J. J. M. (1992). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 30(3), 181-191.
- Vergel M, L., Jaramillo V, J. J., & Rengifo E, G. A. (2003). Producción de cebolla de bulbo ocañera. Manual Técnico. CORPOICA- PRONATTA. Bucaramanga. 40 p.
- Watson, A. V. G., Cerda, R. C., & Vega, C. Z. (2011). Detección del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV) en ajo (*Allium sativum* L) costarricense. *Tecnología en Marcha*, 24(4), pág-47.