

CONSERVACIÓN DE AJO (*Allium sativum* L.) POR REDUCCIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO.

María de los A. Torres, Jacqueline Alonso, Ana Font, Victoria Moreno y Amelia Capote.

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: mtorres@inifat.co.cu**

RESUMEN

El cultivo del ajo se conoce desde tiempos inmemoriales, por su valor como condimento y sus propiedades terapéuticas. En Cuba, la poca variabilidad clonal en la producción, unido a otros factores ha derivado en la erosión del germoplasma existente. Este trabajo está dirigido a evaluar la factibilidad de la conservación *in vitro* de ajo en las condiciones del Banco de Germoplasma del INIFAT. Incluye la evaluación de varios métodos de desinfección del explante así como la conservación de las yemas a la temperatura de 6°C, en replicas de 30 tubos. Como referencia se tomó la temperatura del cuarto de cultivo (24°C). Como caracteres se consideró el número de brotes; el color, la altura, la emisión de hojas, la manifestación de la hiperhidricidad; la ausencia/presencia de bulbo, el número de raíces, la viabilidad, el pardeamiento, la contaminación y el agotamiento y color del medio. La variante en la que se combina el explante al que se separa la base del bulbo (explante BC) y se utiliza como desinfectante hipoclorito de sodio al 5% mostró la menor contaminación sin que se manifestara el deterioro de las vitroplantas. Se demostró que la reducción de la temperatura tuvo el mayor efecto en el retardo del enraizamiento y en la absorción del medio de cultivo; factores delimitaron el período de subcultivo, de las plantas mantenidas a 24°C, a cuatro meses. A 6°C la conservación se prolongó hasta los 18 meses. Las contaminaciones se mantuvieron a niveles bajos y la hiperhidricidad fue despreciable. Los resultados aportan elementos valiosos para acometer la conservación *in vitro* de este germoplasma en el Banco del INIFAT.

Palabras Claves: ajo, conservación in vitro.

SLOW GROWTH *IN VITRO* CONSERVATION OF GARLIC (*Allium sativum* L).

ABSTRACT

Until ancient ages, garlic cultivation is known due to its value as a condiment and its therapeutic properties. In Cuba, low commercial clonal variability besides other aspects derives in its germplasm erosion. The purpose of this paper is to evaluate the feasibility of garlic *in vitro* conservation in the conditions of INIFAT's Genebank. It includes the evaluation of some explant disinfectant methods, and plant conservation at 6°C of samples of 30 culture tubes. Similar samples were conserved at culture room temperature (24°C). The characters considered were the number of shoots, color, height, emission of leaves, hyperhydricity, absence and presence of bulbs, the number of roots, viability, browning, contamination, media color and media consumption. The treatment that combine the explant which the bulb base were cut (BC explant) and as

disinfectant 5% sodium hypochlorite had the lower contamination without plantlet damage. It was demonstrated that temperature decrease has the larger effect in to delay of root emission and the absorption of culture media, which delimit the subculture period of plants, maintained at 24°C, to four months. At 6°C, the conservation period was extended to 18 months. Contamination were kept at low levels and hyperhydricity was insignificant. Results contribute with very valuable elements for developing *in vitro* conservation of garlic germplasm at INIFAT's Genebank.

Key words: *garlic, in vitro conservation.*

INTRODUCCION

El cultivo del ajo enfrenta numerosos retos dado sus requerimientos en cuanto las atenciones culturales (el riego, la fertilización, la aplicación de plaguicidas y el desyerbe), así como el secado postcosecha y el almacenamiento hasta la próxima siembra. Por eso, en diferentes laboratorios se ha trabajado en la posibilidad de utilizar la conservación *in vitro* como una alternativa para asegurar la preservación de su germoplasma (Keller y Lesemann, 1997; Keller y Frits, 1997; Niwata, 1995).

En Cuba, casi toda la producción comercial de ajo se sustenta en pocos clones y existe un mantenimiento mínimo de otros adaptados al país u obtenidos por el mejoramiento genético. La poca variabilidad clonal en la producción, unido a otros factores, como el ser un cultivo de reproducción vegetativa y ciclo corto, expuesto a los virus y al estrés climático, y, en adición, el alto costo y la labor intensiva que requiere el mantenimiento de las colecciones de campo, han derivado en la erosión del germoplasma existente. Esto constituye un alto riesgo para el mantenimiento de la variabilidad del cultivo, lo que entraña una amenaza para los productores ante la aparición de enfermedades o situaciones climáticas adversas. Por ello, en el país se han desarrollado estudios sobre el cultivo *in vitro* del ajo (Peréz, 2000), su aclimatación en diferentes sustratos (Izquierdo *et al.*, 2002) y la producción de semilla por métodos biotecnológicos (Izquierdo y Quiñones, 2001), con el objetivo de preservar la variabilidad del cultivo existente en el país. Este trabajo esta dirigido a evaluar la factibilidad de la conservación del germoplasma de ajo *in vitro* en las condiciones del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT).

MATERIALES Y METODOS.

Desinfección del explante

Se trabajó con los clones 'Criollo' y 'Vietnamita', procedentes de la provincia de La Habana.

Se evaluaron tres variantes del explante: el bulbo (diente) de ajo completo (explante D), el bulbo de ajo completo con un corte de para eliminar la capa más externa de la base (explante BC); y la yema (ápice cubierto con varias hojas, pero sin la hoja engrosada de reserva; explante Y). Siempre que se utilizó este explante, se aplicó una doble desinfección, la primera se realizó al bulbo completo con hipoclorito al 5%, y la segunda después de extraída la hoja de reserva. El desinfectante y la concentración utilizada se especificará para cada tratamiento.

A continuación se resumen las variantes en cuanto al tipo de explante, el desinfectante y la concentración utilizada.

Tipo de explante; forma de desinfección.

- 1) Bulbo completo (explante D); hipoclorito de sodio al 5%
- 2) Bulbo con el corte y separación de la parte externa de la base (explante BC):
 - a) hipoclorito de sodio al 5%
 - b) bicloruro de mercurio al 0.1%
- 3) Yema del bulbo (explante Y);
 - a) primera desinfección: hipoclorito de sodio al 5%
 - b) segunda desinfección: hipoclorito de sodio al 0.5; 1.0; 1.5 y 2.5%.

Tiempo de desinfección: hipoclorito de sodio al 5%: 15 min.
bicloruro de mercurio 0.1%, 5 mn.

Se evaluó periódicamente la contaminación, la supervivencia y el desarrollo de las plantas de la siguiente forma:

Contaminación: mediante el conteo del número de explantes contaminados

Supervivencia: por el conteo del número de cultivos vivos

Desarrollo de las plantas: mediante la evaluación de la altura, número de hojas, y el número de raíces.

Los datos se expresan en porcentaje y se presentan los gráficos mas representativos del comportamiento en cada caso.

Conservación de ajo a 6 °C (por reducción de la tasa de crecimiento).

Material vegetal. Los clones, del mismo origen, se identificaron de acuerdo a los productores que aportaron el germoplasma como 'Fiandol', 'Rosquete', 'Machuá', 'CPA Antero Regalado' y 'Sancti Spiritus' (proveniente del programa de mejoramiento del INIFAT).

Tipo de explante y desinfección: Se seleccionó el explante BC, utilizando hipoclorito de sodio al 5%, durante 15 min.

Conservación a 6 °C. Se evaluó la conservación de las yemas de ajo, utilizando la temperatura de 6°C. Como referencia se utilizó la temperatura del cuarto de cultivo (24°C). Las yemas se mantuvieron en medio BDS (Dustan y Short, 1977), con sacarosa al 10% (El-Gizawy y B.V. Ford-Lloyd., 1987; Keller J. y R. Fritsch, 1997). Cada 15 días se evaluaron los caracteres cualitativos y cuantitativos en las fases de brotes, vitroplantas y microbulbillos. De las características de los brotes, se evaluaron el número, el crecimiento y el vigor. De las vitroplantas, se tuvieron en cuenta el color, la altura, con las categorías (hasta 1, de 2 a 5 y más de 5 cm), la cantidad de hojas (1, de 2 a 3 y más de 4); y la hiperhidricidad (no manifiesta, incipiente y manifiesta). De los microbulbillos se evaluaron el desarrollo (ausencia/presencia), el color de la cubierta (blanco/morado); la viabilidad (%: 100, 75, 50, 25, 0), el enraizamiento (%: 0, de 1 a 2, de 3 a 5, más de 5 raíces); y el pardeamiento (%: 0, 25, 50, 75, 100). A través de todo el período de conservación, se evaluó la contaminación (%: hongos y bacterias) y las

características del medio de cultivo, del que se consideró el contenido en el tubo de cultivo (%: 100, 90, 75, 50 y 25) y el color.

RESULTADOS

Desinfección del explante

En la Figura 1, resulta evidente que el tratamiento correspondiente al corte de la base del bulbo (explante BC) produjo una reducción notable de la contaminación, en comparación con los bulbos completos, que conservan la parte externa de la zona de fijación al tallo verdadero (explante D). Esta zona, por su contacto directo con el suelo y su estructura porosa, tiende a la acumulación de los microorganismos. Tanto en los tratamientos en que se utilizó el explante Y (la yema del bulbo sin la hoja de reserva) como en el que se utilizó bicloruro de mercurio (tratamiento BC bc 0.1) se produjo la reducción de la supervivencia (Figura 2) y el vigor de las plantas.

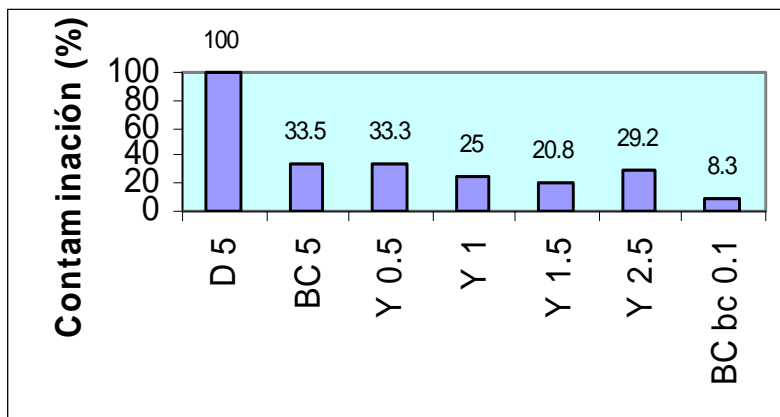


Figura 1. Comportamiento de la contaminación para los distintos tratamientos de desinfección del explante

Leyenda : Bulbo completo (D)

Corte de la base del explante (BC)

Concentración: hipoclorito de sodio (0.5; 1.0; 1.5; 2.5 y 5%)

Bicloruro de mercurio al 0.1% (bc 0.1)

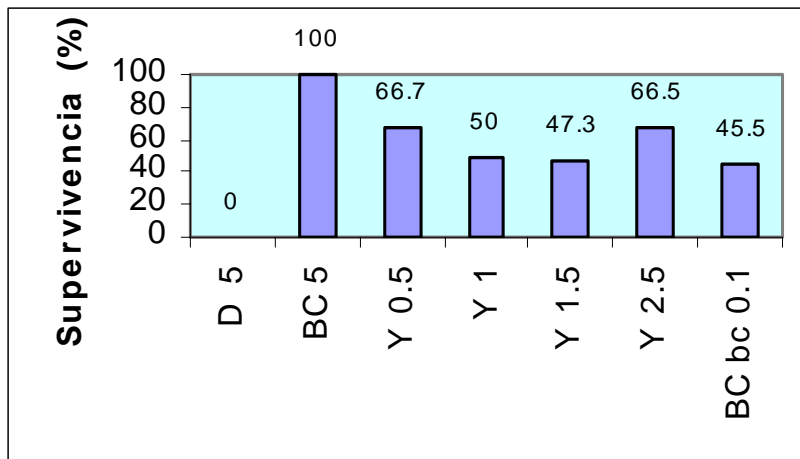


Figura 2. Comportamiento de la supervivencia de las plantas según los distintos tratamientos de desinfección del explante

Leyenda : Bulbo completo (d)

Corte de la base del explante (BC)

Concentración de hipoclorito de sodio (0.5; 1.0; 1.5 y 2.5%)

Bicloruro de mercurio al 0.1% (bcm 0.1)

Por otra parte, la comparación de los resultados recogidos en las Figuras 1 y 2 permite apreciar que la eliminación de la hoja de reserva (explante Y) produjo un efecto mayor en la reducción de la supervivencia de las plantas que en el control de la contaminación (compárese con el tratamiento BC 5; corte de la base del bulbo, desinfectado con hipoclorito al 5%). Esto podría tener una explicación en el hecho de que en la fase de cultivo *in vitro* también se produce la translocación de nutrientes de la hoja de reserva al ápice en crecimiento, lo cual se evidencia en el adelgazamiento de esta hoja. Además de la reducción cuantitativa de la viabilidad, resultó evidente que todas las plantas desarrolladas a partir de yemas resultaron cloróticas y poco vigorosas, por lo que esta variante no parece deseable para mejorar la desinfección. La aplicación de bicloruro de mercurio al 0.1% fue el tratamiento menos favorable debido a su alta toxicidad, lo cual ha sido señalado por otros autores (Izquierdo y Quiñónez, 2001; Izquierdo *et al.*, 1997). A pesar de que la yema de crecimiento tenía la protección de la hoja de reserva, como corresponde al explante BC, el desarrollo de las plantas se detuvo y el crecimiento de las hojas no superó los 2 cm. Como puede observarse, los niveles de contaminación fueron relativamente altos en general, ya que como ha sido señalado por Makowska *et al.* (1999) el bulbo, como explante, es más vulnerable a la contaminación que otras estructuras aéreas.

Conservación de ajo a 6 °C (por reducción de la tasa de crecimiento).

A la temperatura de 6^oC se observó la reducción de la tasa de crecimiento de los cultivos, lo cual se manifestó en que las plantas conservadas a 6^oC requirieron mayor tiempo para alcanzar la altura de 5cm, para que resultara evidente la bulbificación y se produjera el enraizamiento profuso (de 3 a 5 raíces)(Figura 3a, 3b y 3c). La disminución de la temperatura de conservación tuvo el menor efecto en la emisión de la primera hoja y resultó mas notable en el desarrollo de las raíces, ya que a 6^oC el tiempo para alcanzar el enraizamiento profuso (de 3 a 5 raíces) fue aproximadamente 5 veces el requerido a 24^oC (Figuras 3a y 4).

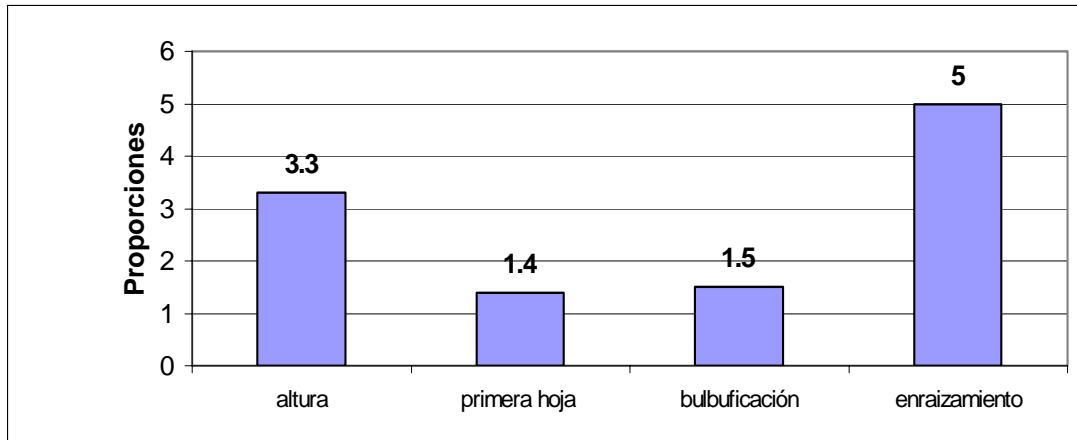
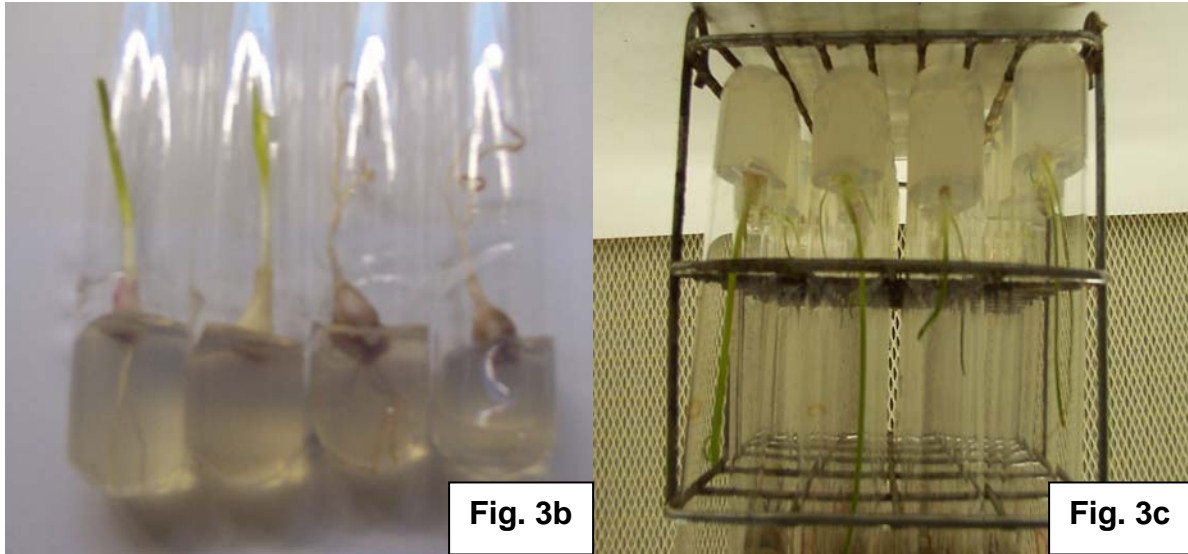


Figura 3a. Proporción (en veces) en que la temperatura de 6^oC retardó la manifestación de los procesos fisiológicos en relación con la temperatura de 24^oC.

Leyenda: Altura: 5 cm ó mas
 Emisión de la primera hoja
 Enraizamiento: de 3 a 5 raíces .

El cálculo se realizó a partir de los valores promedios, considerando los 5 clones evaluados.



Figuras 3 by 3c. Comparación del desarrollo alcanzado por las plantas a la temperatura de 24°C (izquierda) y a 6°C (derecha) a los 4 meses de conservación. Clon 'Machuá' (3b). Características del desarrollo de vitroplantas de ajo) (6°C, 4 meses) (3c).

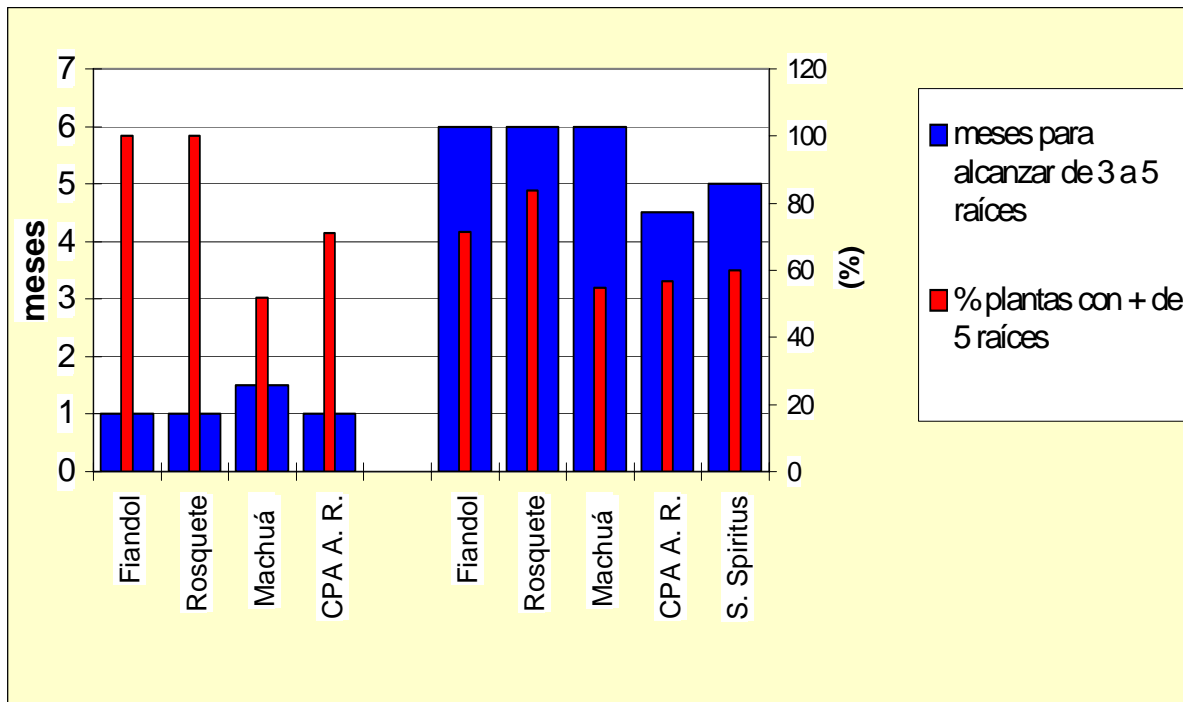


Figura 4. Comparación del tiempo requerido para que más del 50% de las plantas conservadas, a las temperaturas de 24 y 6°C, desarrollen de 3 a 5 raíces (barras azules) y del porcentaje de plantas que alcanzan ese grado de enraizamiento (barras en diagonal). La comparación estadística para el porcentaje de plantas no arrojó

diferencias significativas entre los clones o las temperaturas $S_x=0.1$; $CV=4.2$ (Análisis de varianza de clasificación doble para muestras univalentes; Lerch, 1977).

La contaminación observada no fue alta, ya que sólo se perdieron 3 muestras al año de la conservación, por lo que ésta no parece ser un aspecto limitante para la conservación a baja temperatura. Este resultado ofrece un criterio favorable a la reducción del número de tubos de cultivos a conservar, por cada clon, entre los 10 y 15 tubos.

A 6°C, el contenido de medio en los tubos de cultivo decreció en un 25% respecto al inicial, de modo que las plantas llegaron a alcanzar el año de conservación y aún se mantenía, aproximadamente, un 75 % del contenido del medio a los 18 meses (no se muestran los datos). También se observó la coincidencia entre la manifestación profusa del enraizamiento y el desarrollo de cierta tonalidad naranja en el medio de cultivo a los 6 meses de conservación, lo que puede estar vinculado a la acumulación de metabolitos. Estos dos resultaron los factores limitantes del período de subcultivo; por ello, los procedimientos que limiten la emergencia y el desarrollo de las raíces podrían contribuir a extender la conservación *in vitro* de ajo, mediante la reducción de la tasa de crecimiento por la disminución de la temperatura del cuarto de cultivo.

CONCLUSIONES

- La separación de la hoja de reserva del bulbo (explante Y) no resultó adecuada para reducir la contaminación, aún cuando se utilizó para la segunda desinfección concentraciones de hipoclorito tan bajas como el 0.5%.
- La desinfección con bicloruro de mercurio no resultó favorable en las condiciones ensayadas, ya que afectó la viabilidad de los explantes.
- Cuando se utilizaron los explantes en los que sólo se eliminó la parte externa del tallo basal del bulbo (explante BC) y se utilizó para la desinfección hipoclorito al 5% se produjo la reducción de la contaminación y las plantas se desarrollaron adecuadamente sin evidencias de deterioro. Este fue el tratamiento más ventajoso dentro de las variantes ensayadas.
- La reducción de la temperatura a 6°C, durante la conservación *in vitro*, tuvo el mayor efecto sobre el enraizamiento, y fue este el carácter que, junto al cambio de coloración del medio, obligó a la transferencia a medio fresco y delimitó el período de subcultivo.
- A 6°C la conservación pudo extenderse hasta 12 meses con pocas pérdidas por contaminación, lo que ofrece un criterio favorable a la reducción del número de tubos de cultivos a conservar, por cada clon, entre los 10 y 15 tubos.

RECOMENDACIONES

- Continuar evaluando el explante en el que sólo se corta la parte externa de la base del bulbo (BC) con otros tratamientos de desinfección.

REFERENCIAS

Dunstan, D. I. y K. C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70-72.

- El-Gizawy y B.V. Ford-Lloyd. 1987.** An *in vitro* method for the conservation and storage of garlic (*Allium sativum*) germplasm. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 9: 147-150.
- Izquierdo, H. y Y. Quiñones. 2001.** Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. TEMAS /septiembre –diciembre. <http://www.utm.mx/temas-docs/notas15R2.pdf>.
- Izquierdo, H.; Y. Quiñónez; R. Disotuar; D. Pedroso. 2002.** Cultivos Tropicales. Vol. 23. No. 3: 63-69.
- Keller J. y R. Fritsch. 1997.** Establishment of *in vitro* clones in the Gatersleben garlic collection.
- Keller, J. y D. E. Lesemann. 1997.** Application of *in vitro* culture to onion and garlic for the management and use of genetic resources at Gatersleben. Proc. I Int. Symp. Edible Alliaceae. Eds. J.L. Burba and C.R. Galmarini. Acta Hort. 433. ISH. 141-150.
- Lerch, G. 1977.** La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-Técnica, La Habana. 452 p.
- Makowska Z. J. Keller y F. Engelmann. 1999.** Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. Cryo-Letters 20: 175-182.
- Niwata, E. 1995.** Criopreservation of apical meristems of garlic (*Allium sativum* L.) and high subsequent plant regeneration. Cryo-Letters 16: 102-107.
- Pérez, A. 2000.** Aspectos del cultivo *in vitro* en el ajo: establecimiento, multiplicación y bulbificación. En: Proyecto Crioconservación de cultivos de reproducción vegetativa para el desarrollo de colecciones principales. CITMA 300043, INIFAT, Cuba. 107 p.