

DESARROLLO Y ACLIMATACIÓN DE MICROBULBILLOS DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.) PARA LA CONSERVACIÓN DE GERMOPLASMA.

María A. Torres, Jacqueline Alonso, Ana Font, Yadira Muñoz, Marisel Ortega, N. Arrozarena, B. Dibut, Victoria Moreno.

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

RESUMEN

En Cuba, el ajo (*Allium sativum* L.) es una especie muy apreciada debido a sus propiedades culinarias y medicinales, pero su variabilidad clonal es baja. Por esta razón, la posibilidad de su conservación *in vitro* se avalúa en el Banco de Germoplasma del INIFAT. Se evaluó la formación *in vitro* de los bulbillos y la interrupción de la dormancia, la composición del sustrato para la aclimatación y las características de los bulbos en el momento de la cosecha. Los bulbillos producidos *in vitro*, necesitaron al menos tres meses para interrumpir la dormancia, y las plantas desarrolladas en la materia orgánica fueron las que mostraron los mayores niveles de supervivencia. Los bulbillos producidos *in vitro* desarrollaron, en condiciones de organopónico, plantas que conservaron sus características originales.

ABSTRACT

In Cuba, garlic (*Allium sativum* L.) is an very appreciated specie due to its culinary and medicinal properties, but its clonal variability is low. That is why, the feasibility of garlic *in vitro* conservation at INIFAT's Gene Bank is evaluated. *In vitro* bulblet formation and *in vitro* bulblets dormancy breaking, substrate composition for field acclimatization, and bulb characteristics at harvest were evaluated. *In vitro* bulbils needed at least three months at 6°C for breaking dormancy and plantlets developed in organic substrate had the highest survival rates. *In vitro* bulbils developed, in organoponic conditions, plants which kept its original characteristics.

INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie de notable valor culinario y medicinal. En Cuba, la poca variabilidad clonal en la producción, unido a otros factores ha derivado en la erosión del germoplasma existente. Además, por ser un cultivo anual, las colecciones de campo están sometidas a los riesgos que entraña la alternancia de la fase de campo con un período de almacén. Por ello, en el Banco de Germoplasma del INIFAT se está evaluando la factibilidad de la conservación *in vitro* de ajo con el objetivo de rescatar y preservar la variabilidad del cultivo existente en el país. Para que la conservación *in vitro* sea aplicable es necesario que una vez concluida la fase de conservación, se logre una adecuada aclimatación de las plantas a las condiciones *in vivo* para el restablecimiento de sus características propias en las condiciones de campo, y el desarrollo de una planta capaz de reproducirse y mantener el material original. Este resultado ofrece

los datos sobre la aclimatación de las plantas al sustrato y la recuperación de las plantas de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con microbulbillos de ajo obtenidos por el desarrollo del ápice de crecimiento, con la hoja de brotación del diente, en medio BDS (Dustan y Short, 1977) enriquecido con sacarosa al 10%. El tiempo de conservación estuvo determinado, principalmente, por la maduración de los microbulbillos (la que se evidencia por la deshidratación de las hojas y la cubierta del bulbillo) y por el consumo del medio de cultivo, que varió, en dependencia de los clones, entre 3.5 y 6 meses. Al final del período de conservación, se evaluó el diámetro y la altura de los microbulbillos con un pie de rey (en mm), y el peso se midió en una balanza analítica de capacidad de 10g y precisión 0.1mg.

Dormancia

Los bulbillos se dejaron secar una semana a la temperatura del cuarto de cultivo (24°C). Posteriormente, se mantuvieron a la temperatura de 6°C hasta que los brotes de crecimiento de los bulbillos alcanzaron de 1 a 2 cm de longitud.

Aclimatación

Los microbulbillos germinados se transfirieron al sustrato para el desarrollo de las plántulas, en vasos plásticos de 200 ml. Se utilizaron tres variantes de sustrato, los que fueron previamente esterilizados:

- 1) zeolita
- 2) mezcla de zeolita y materia orgánica (1:1)
- 3) materia orgánica, MO: humus de lombriz

Las plantas se mantuvieron en dicho sustrato hasta que alcanzaron, aproximadamente, los 10 cm de altura.

En el caso de los clones Guira y Alquizar se realizó la aplicación de un biopreparado para estimular el vigor y el enraizamiento de las plántulas.

Este preparado consistió una combinación *Azotobacter chroococum* y *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*.

Después que las plántulas alcanzaron los 10 cm, se transplantaron a un organopónico, con un sustrato compuesto por una mezcla 1:1 de capa vegetal y materia orgánica (humus de lombriz), en el período óptimo para el cultivo (de octubre a noviembre).

Durante los primeros 20 días en el organopónico, las plantas se taparon para disminuir la incidencia de las radiaciones solares. Las plantas se revisaron sistemáticamente para controlar la aparición de plagas, y las atenciones culturales propias del cultivo en organopónico. Las plantas se cosecharon cuando llegaron a su fase de maduración que se hizo manifiesta por la caída del falso tallo.

A los plantas cosechadas se les evaluó el diámetro y la altura de los bulbos (cabeza), según el procedimiento descrito anteriormente.

Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente, según el diseño de cada experimento, por análisis de varianza de clasificación simple para muestras compuestas, mediante el programa estadístico Statgraphics plus Versión 5.0 (1994-2000) o el análisis de varianza de clasificación doble para muestras univalentes (Lerch, 1977).

RESULTADOS

Tiempo en el que se desarrollan los procesos biológicos

En la Figura 1 se observa que el período de conservación de los 5 clones evaluados, determinado por la maduración completa de los microbulbillos, y por el consumo del medio de cultivo fluctuó entre los 3.5 y los 6 meses, resultado similar al obtenido anteriormente con otros clones (Torres y col., 2003). Así mismo, se puede apreciar que los microbulbillos tuvieron que ser mantenidos por más de 3 meses, a temperatura de 6°C, para eliminar la dormancia. En cuanto al período de adaptación de los bulbillos al sustrato se observó una notable diferencia, que debe estar relacionada con la aplicación de los bioestimuladores a los clones Guira y Alquizar. El tiempo necesario para el desarrollo de las plantas en la fase de organopónico estuvo entre los 4 y 6 meses.

Características de los bulbillos

La Figura 2 representa las dimensiones de los microbulbillos obtenidos al final de la conservación y en ella evidencian diferencias entre los clones evaluados, que resultaron significativas en el diámetro y el peso, con una fluctuación del peso entre los 381 y 676 mg y del diámetro entre los 9.8 y 6.6 mm, como promedio. Estos valores del diámetro están por encima de los reportados por Torres *et al.* (2001) como adecuados en su trabajo dirigido a la obtención de microbulbillos a partir del cultivo de ápices caulinares. Los valores del peso son superiores a los referidos por Nagakubo *et al.* (1993) a partir de plántulas propagadas *in vitro*.

Influencia del sustrato en la aclimatación

La influencia del tipo de sustrato en la fase del desarrollo de plántulas, a partir de los microbulbillos germinados, se representa en las Figuras 3 y 4. En la Figura 3 se representa que la materia orgánica (humus de lombriz) fue el sustrato donde se obtuvo el mayor desarrollo de brotes y plántulas (con valores superiores al 60%) y el valor más alto de supervivencia total (73.9%). Esto resulta positivo desde el punto de vista práctico ya que este sustrato cuyo valor en la nutrición vegetal ha sido comprobado se produce y utiliza comúnmente en el país para la producción agrícola por lo que resulta de relativamente bajo costo y fácil adquisición. En contraste, el uso de la zeolita o la mezcla (1:1) materia orgánica y zeolita no favorecieron el desarrollo de los brotes y de las plántulas es las condiciones experimentales ensayadas, y la supervivencia correspondió a los microbulbillos que aún no habían germinado. Las relaciones de la supervivencia total entre los tratamientos se resume en la Figura 4.

La Figura 5 recoge como se comporta la emergencia de las plántulas en el tiempo, para los tratamientos evaluados. En ella se puede observar que después de los primeros 12 días, de la siembra en tierra de los microbulbillos, no se produjeron

variaciones sustanciales en el porcentaje de plántulas desarrolladas; o sea, en los microbulbillos en los que el tratamiento a 6°C había eliminado la dormancia no se requirió más de 15 días para que las plántulas emergieran. Esto tiene importancia desde el punto de vista práctico, ya que permite en un periodo breve reincorporar los microbulbillos no germinados a la baja temperatura para continuar su tratamiento, evitando que se deterioren por estar expuestos al sustrato sin haber alcanzado la capacidad germinativa. Sin embargo, en el caso en que no se aplicó bioestimuladores al sustrato, se requirió de al menos 30 días para que las plántulas alcancen los 15 cm, valores comparables a los obtenidos por Izquierdo *et al.* (2002) utilizando como sustrato una mezcla 1:1 de materia orgánica y suelo. La aplicación de bioestimuladores obtenidos de una combinación *Azotobacter chroococum* y *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* acortaron este período a un término de 15 días en los clones Güira y Alquizar. La evaluación de este efecto es objeto de estudios en desarrollo. El tipo de sustrato fue el factor que resultó significativo, con los mejores resultados en el porcentaje de plántulas desarrolladas (Figura 5) y en la altura de las plántulas (Figura 6) para la materia orgánica (humus de lombriz).

Características de los bulbos de campo

Las características de los bulbos (cabezas) cosechados en el organopónico se representan en la Figura 7. Se observan diferencias entre los clones en el número de hojas por plantas, el diámetro y el peso promedio de los bulbos. Izquierdo y Quiñónez (2001), al estudiar los bulbos desarrollados en la fase de campo a partir de microbulbillos desarrollados *in vitro*, también reportaron el diámetro de los bulbos entre los factores que más contribuyeron a la variabilidad entre los clones estudiados, así como la masa media y el ancho de los dientes, pero los autores no hacen referencia a las diferencias entre los bulbos. En este trabajo las diferencias más notables entre clones se encontró en el peso de los bulbos. El clon Quivicán produjo bulbos de peso promedio de 10g, y algunos alcanzaron talla y peso similares a los de los comerciales. También se encontraron diferencias en el diámetro, pero no se encontraron en la altura de los bulbos, al igual que se observó en la comparación de las dimensiones de los microbulbillos (Fig. 2). Los bulbos obtenidos en todos los casos mantienen las características morfológicas propias del cultivo y se conservan como semillas para ser evaluados en la época de siembra favorable a la especie.

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias entre los clones en relación con el diámetro y el peso de los microbulbillos.

Para eliminar la dormancia de los microbulbillos fue necesaria su exposición a la temperatura de 6°C, por un período no menor de 3 meses.

La materia orgánica (humos de lombriz) resultó un sustrato apropiado para la siembra de los microbulbillos. Los valores de supervivencia obtenidos fluctuaron entre el 73.4 y el 100%.

Independientemente del sustrato, los brotes emergieron en las dos primeras semanas de la siembra de los microbulbillos, lo que posibilita acortar el tiempo en

que los microbulbillos no germinados puedan ser reincorporados al tratamiento para eliminar la dormancia.

Los microbulbillos desarrollados *in vitro* generaron plantas que completaron su ciclo biológico en el organopónico y produjeron bulbos con las características morfológicas de las plantas originales.

RECOMENDACIONES

Evaluar mayores concentraciones de sacarosa para inducir la bulbificación de los clones que desarrollen microbulbillos de menor talla.

Evaluar el uso de reguladores del crecimiento para acortar el tiempo necesario para eliminar la dormancia (3 meses).

Profundizar en el efecto de los bioestimuladores sobre la reducción del tiempo necesario para la aclimatación

REFERENCIAS

- Dunstan, D. I. y K. C. Short. 1977.** Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70-72.
- Izquierdo, H.; Y. Quiñónez. 2001.** Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. *Temas* (septiembre-diciembre) <http://www.utm.mx/temas-docs/nfnotas15R2.pdf>.
- Izquierdo, H.; Y. Quiñónez, R. Disotuar y D. Pedroso. 2002.** Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatación de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.). *Cultivos Tropicales*, vol. 23, no. 3 p. 63-69.
- Lerch, 1977.** La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-Técnica, La Habana, 1977.
- Nagakubo, T.; A. Nagasawa y H. Ohkawa. 1993.** Micropropagation of garlic through *in vitro* bulble formation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 32:175-183.
- Torres, A.C. ; A. Nepomuceno; R. De Oliveira y J. Amauri. 2001** Produção de alho-semente com alta qualidade fitosanitaria mediante cultura de ápices caulinares. *Embrapa Circular Técnica* 27, 8p.
- Torres, M.A 2003; J.Alonso; A. Font y V. Moreno.** Conservación de yemas de ajo a baja temperatura. En: *Caracterización, Conservación y ampliación de la variabilidad genética del germoplasma de ajo en Cuba.* Proyecto de Investigación. PN Biotecnología CITMA

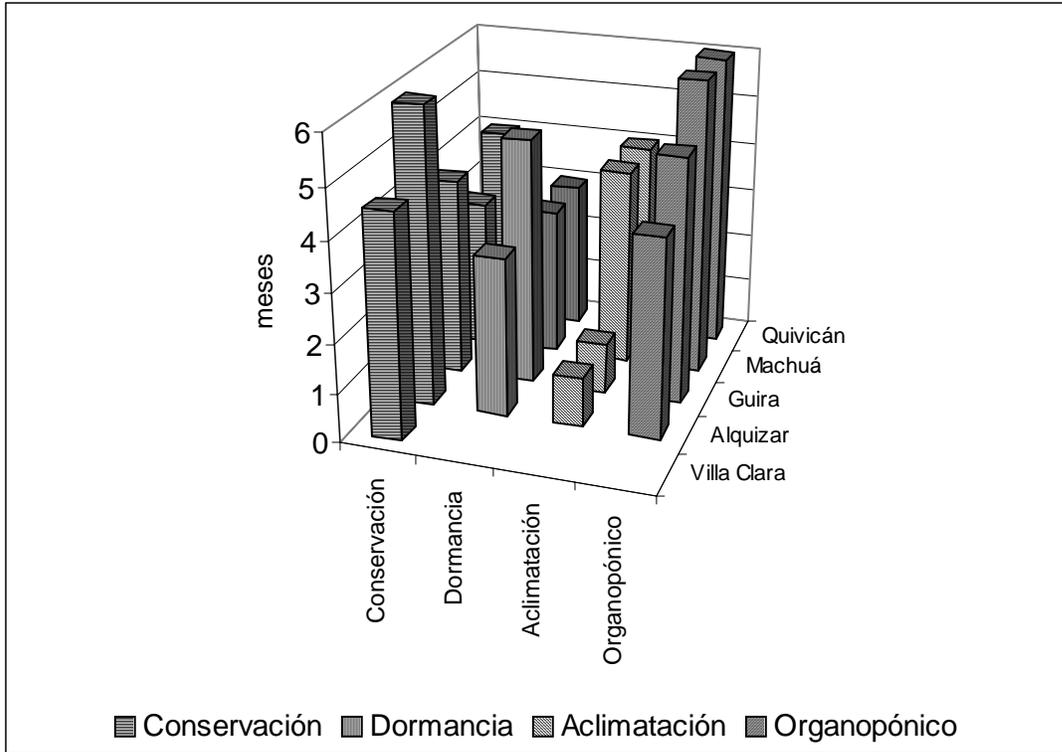
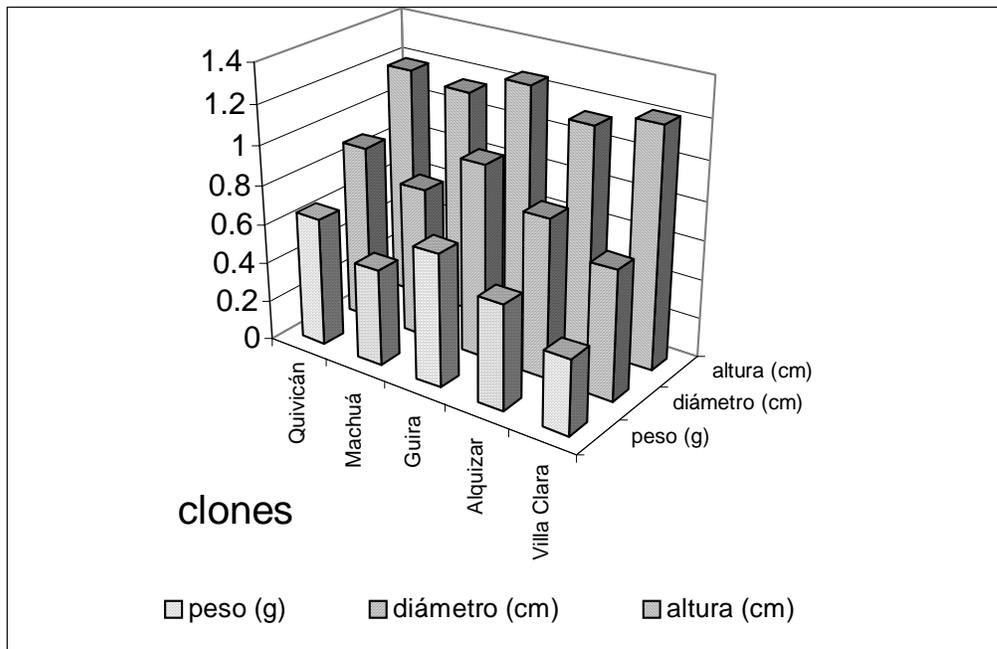


Figura 1. Tiempo en el que se desarrollaron los procesos biológicos (conservación, dormancia, aclimatación y desarrollo en el organopónico) de diferentes clones de ajo



Clon	Peso (mg)	Diámetro (mm)	Altura (mm)
Quivicán	655 a	9.0 a	11.4
Machuá	493 b	7.7 b	11.5
Güira	676 a	9.8 a	11.8
Alquizar	532 ab	8.1 b	12.2
Villa Clara	381 b	6.6 c	12.4
	$S_D = 0.34$	$S_D = 0.04$	ns $S_R^2 = 0.035$

Figura 2. Características de los bulbillos (peso, diámetro y altura) de diferentes clones al final de la conservación.

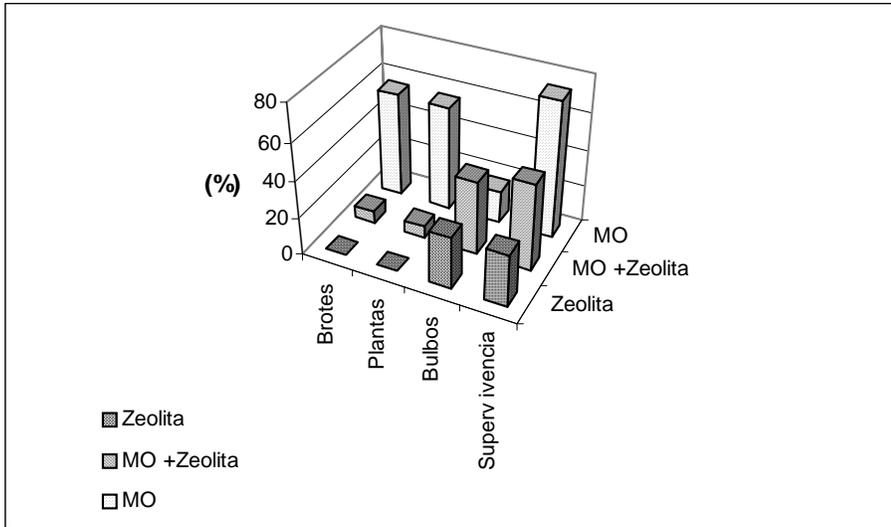


Figura 3. Influencia del sustrato en el crecimiento de los brotes, el desarrollo de plántulas, la cantidad de microbulbillos no germinados y la supervivencia total durante la aclimatación.

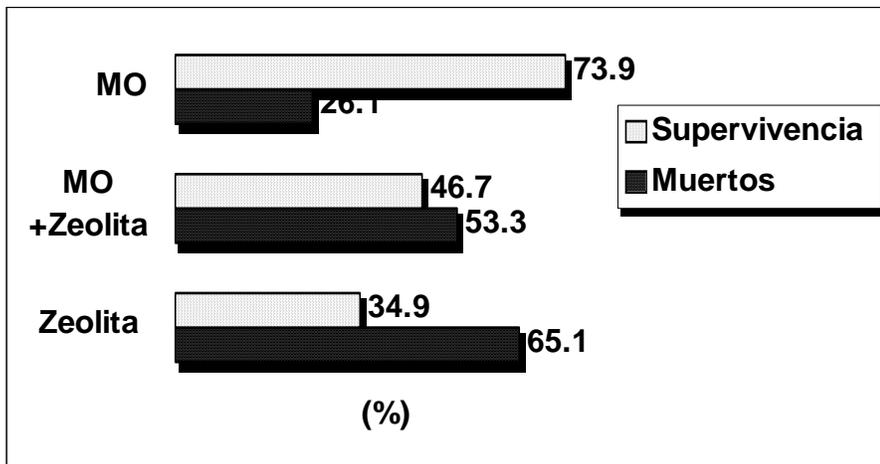
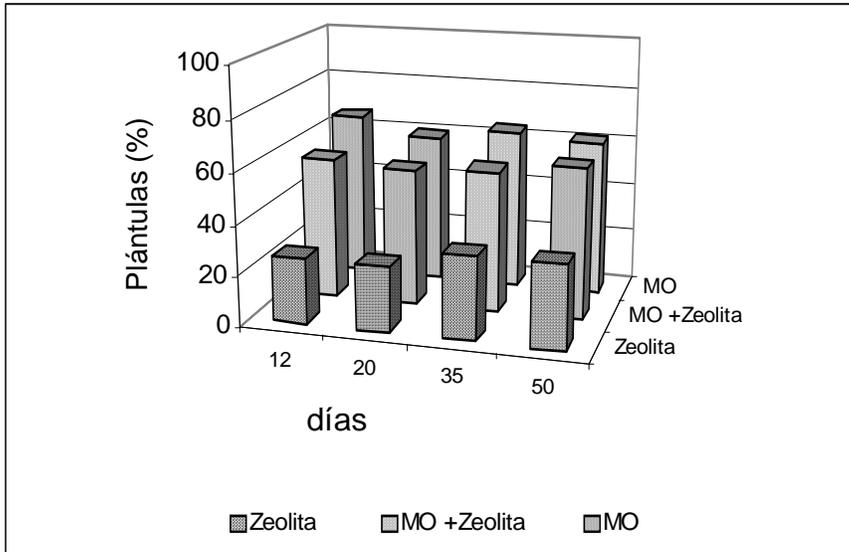


Figura 4. Comparación de la supervivencia total obtenida en las variantes del sustrato evaluadas.



MO	62.8 a	$S_x=1.7$
MO+Zeolita	56.5 b	
Zeolita	29.8 c	

Figura 5. Porcentaje de plántulas desarrolladas en el tiempo para las variantes de sustrato evaluadas. Factor significativo: tipo de sustrato.

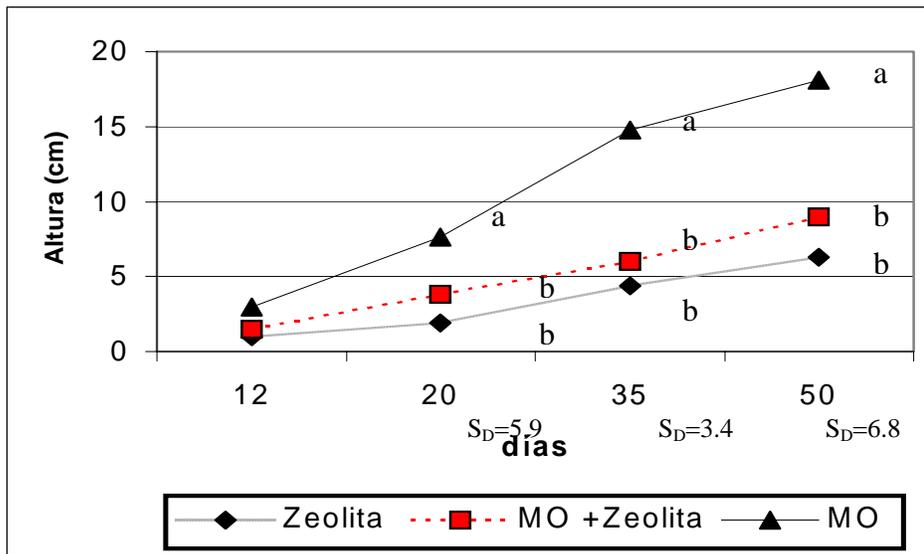
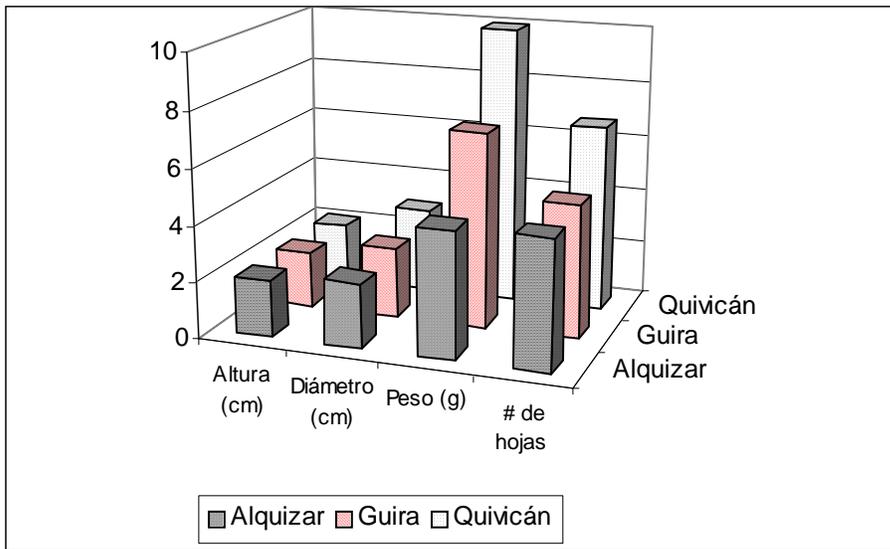


Figura 6. Altura de las plántulas en el tiempo para las variantes de sustrato evaluadas.



Clon	Peso (g)	Diámetro (cm)	Altura (cm)	no. de hojas
Quivacán	10.0 a	3.0 a	2.1	6.7 a
Guira	7.0 ab	2.5 a	2.0	4.6 b
Alquizar	4.5 b	2.3 b	2.0	4.6 b
	$S_D=4.1$	$S_D=0.55$	ns $S_R^2=0.23$	$S_D=1.6$

Figura 7 Características de los bulbos de campo