

MÉTODO DE DESINFECCIÓN PARA EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE BULBOS DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)

María de los A. Torres Mederos, Ana Julia Rodríguez Mansito, Ana Font Grimont y Norma Marrero Granado

RESUMEN

Los ápices de crecimiento de los bulbos de ajo (dientes), son explantes vigorosos para los trabajos de cultivo de tejidos, pero usualmente presentan altos niveles de contaminación con los microorganismos del suelo, por ser órganos de crecimiento subterráneo. Los experimentos están dirigidos a comparar diferentes variantes para la desinfección del bulbo, utilizando como desinfectantes hipoclorito de sodio al 0.5-5% y bicloruro de mercurio al 0.1 %. Durante el desarrollo de los explantes, se contabilizaron las plantas contaminadas y las plantas vivas, para evaluar la supervivencia de los cultivos. El desarrollo de las vitroplantas se evaluó cada 15 días, cuantificando las hojas, las raíces, y las plantas que formaron bulbillos. El procedimiento consistente en aplicar hipoclorito de sodio al 5 % durante 15 minutos; seguido de cortar 1mm de la capa más externa y flamear ligeramente la base del diente permitió obtener niveles de desinfección aceptables de los bulbos de ajo, con valores de descontaminación en el entorno del 70 %, sin producir deterioro de las plantas.

Palabras claves: ajo, desinfección, establecimiento *in vitro*

Decontamination method for *in vitro* establishment of garlic (*Allium sativum* L.) bulbs

ABSTRACT

Apices of garlic bulbs (cloves) are vigorous explants for tissue culture practices, but they usually present high contamination levels with soil microorganisms, due to they are underground growing organs. The experiments were done to compare different decontamination variants of garlic clove, with sodium hypochlorite solutions (0.5-5% available chlorite) or a 0.1% mercuric chlorite, as disinfectants. During explants development, contaminated plants and alive plants were quantified, in order to evaluate culture survival. Plantlet development was evaluated every 15 days, quantifying the number of leaves, roots, and bulblets. Applying 5% sodium hypochlorite during 15 min, followed of cutting 1 mm of the most external layer and flaming the base of garlic bulb, acceptable disinfection levels of garlic cloves were obtained, with decontamination percentages ranging around 70%, without plant damage.

Key words: garlic bulbs, decontamination, *in vitro* establishment

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical «Alejandro de Humboldt» (INIFAT)
✉ genetica10@inifat.co.cu

INTRODUCCION

El ajo es una especie de alto valor culinario y medicinal; por ello, la conservación de su germoplasma es objeto de atención a nivel mundial (ECP/GR Working Group on *Allium*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2007; Shemesh *et al.*, 2008; Stavilíková, 2008).

Los bulbos de ajo colectados de campo, debido a su desarrollo subterráneo, se caracterizan por un alto nivel de contaminación, lo que dificulta lograr su desinfección para el mantenimiento en condiciones asépticas, durante el cultivo *in vitro*. Así Makowska *et al.* (1999), en sus experimentos sobre crioconservación de ajo, encontraron que los ápices de los dientes mostraron mayor regeneración que los ápices de los bulbillos aéreos; sin embargo, los dientes mostraron la desventaja de que estuvieron más infestados con los microorganismos del suelo. Keller y Lesemann (1997) también hicieron referencia a la desventaja de los dientes como explante respecto a los microbulbillos de la inflorescencia, debido a mayores niveles de infección de los dientes procedentes del suelo.

La mayor parte de los clones que se cultivan en Cuba son del tipo de ajos blancos, que por lo general no emiten vara floral (Burba, 2008), y solo producen pocos bulbillos aéreos en una posición intermedia del pseudotallo; por ese motivo, los bulbillos aéreos constituyen una fuente de explantes que aporta pocas réplicas por planta; mientras que los dientes constituyen una fuente de la que pueden obtenerse explantes vigorosos en mayor número.

En la última década en el INIFAT se ha trabajado para desarrollar la conservación *in vitro*, por reducción de la tasa de crecimiento y la crioconservación, como forma de conservación complementaria a la colección de campo, para disminuir los riesgos de pérdidas de los clones adaptados a las condiciones ambientales de Cuba u obtenidos por mejoramiento genético. Éstos constituyen un germoplasma de gran valor, que se encuentra amenazado, ya que en general son pocos los productores que cultivan el ajo en el país, debido a que la especie requiere de altas exigencias culturales y alto costo de producción; y por otra parte, es un cultivo

muy sensible a las condiciones del medio y su época de desarrollo en el año es muy limitada en las condiciones de Cuba (Muñoz *et al.* 2010)

Utilizar un método de desinfección del bulbo que permita erradicar los microorganismos del suelo y conservar las entradas en estado aséptico, constituye un requisito indispensable para los objetivos del establecimiento *in vitro* y la conservación del germoplasma. Este trabajo está dirigido a desarrollar un método de desinfección apropiado para las investigaciones desarrolladas sobre a la conservación *in vitro* de ajo en el Banco de Germoplasma del INIFAT.

MATERIALES Y METODOS

Tipo de explante y desinfectantes

Los experimentos se realizaron con dos clones Criollos. Uno procedente de la localidad de Quivicán, provincia de La Habana, y otro procedente de Villa Clara, el cual había mostrado un alto nivel de contaminación. En este trabajo los clones se identificaron según la provincia de procedencia.

Todas las variantes experimentales se trataron inicialmente de la siguiente forma: los bulbos (dientes) se lavaron con agua y detergente, y después de enjuagar hasta eliminar los residuos de detergente con agua corriente, se desinfectaron con etanol al 70 %, durante un minuto.

Como desinfectantes se utilizaron hipoclorito de sodio al 0.5-5 % (v/v) y bicloruro de mercurio al 0.1% (v/v), teniendo en cuenta su disponibilidad y la experiencia de trabajo previa con estos reactivos. La aplicación del hipoclorito de sodio se realizó agregando de dos a tres gotas de Tween 80, como humectante.

Variantes experimentales

- 1) Tipo de explante; concentración del desinfectante
 - ◆ D-5: Diente completo (ápice de crecimiento, primordios foliares, hoja de brotación y hoja de reserva) ; hipoclorito de sodio, concentración 5 %.

- ◆ R-5: Diente con la hoja de reserva, después de la desinfección con hipoclorito de sodio al 5% se eliminó aproximadamente 1 mm de la parte externa de la base (zona de inserción en el tallo verdadero subterráneo).
- ◆ R-BCM-0.1: Diente con la hoja de reserva, después de la desinfección con bicloruro de mercurio al 0.1 %, se eliminó aproximadamente 1 mm de la parte externa de la base del bulbo.
- ◆ B-0.5; B-1.0; B-1.5; B-2.5: Hoja de brotación (ápice de crecimiento, primordios foliares, hoja de brotación) sin la hoja de reserva; hipoclorito de sodio al 0.5; 1.0; 1.5 y 2.5 %.

Las características de los tratamientos se resumen en la Tabla 1.

2) Tiempo de desinfección

Para el tratamiento R-5 se consideraron dos períodos de tratamiento con el desinfectante: cinco y 30 minutos.

3) Flameo del explante

Se realizó con el clon Villa Clara, ya que la muestra disponible no pudo ser descontaminada con el tratamiento R-5.

Se probó adicionar al tratamiento R-5 un flameo ligero antes de la siembra. Este flameo consiste en un pase rápido del explante por la llama de un mechero de alcohol, ya que si el tiempo de exposición a la llama se prolonga

se puede afectar el explante, disminuyendo el enraizamiento o la germinación de la hoja de brotación, durante el cultivo *in vitro*.

Variantes

1. Tratamiento R-5, sin flameo.

1. Tratamiento R-5, con un flameo ligero, en lo adelante, R-5F.

Después de la desinfección, los explantes se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) (1962) sin hormonas, gelificado con 6g l⁻¹ de agar, y se mantuvieron en el cuarto de cultivo, en condiciones de 24±2°C y fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad. La concentración de agar y las condiciones de temperatura e iluminación del cuarto de cultivo se mantuvieron inalterables para el resto de los experimentos.

En todos los tratamientos, se evaluó, periódicamente, el número de tubos contaminados. La supervivencia de los explantes se evaluó mediante la cuantificación de los cultivos vivos. Como indicador del vigor de las plantas se evaluó el desarrollo de las plántulas cada 15 días, por la cantidad de hojas y raíces; y se cuantificaron las plantas que llegaron a bulbificar, considerando la ausencia o presencia de microbulbillos. El porcentaje de plantas bulbificadas se calculó según la expresión (cantidad de plantas bulbificadas/total de plantas) x 100.

Tabla 1. Características de tratamientos respecto al tipo de explante; concentración del desinfectante

Tratamiento	Tipo de explante	Estructura del explante	Desinfectante	Concentración % (v/v)
D-5	Diente completo	Hoja de reserva+hoja de brotación+primordios foliares+ápice	Hipoclorito de sodio	5
R-5	Hoja de reserva-1 mm base (R)		Bicloruro de mercurio	0.1
R-BCM-0.1				
B-0.5	Brote (B)	Hoja de brotación +primordios foliares +ápice	Hipoclorito de sodio	0.5
B-1				1.0
B-1.5				1.5
B-2.5				2.5

Tiempo de tratamiento: 15 minutos

Para evaluar el efecto del flameo se utilizaron muestras compuestas de 40 explantes; en el resto de los experimentos el tamaño de las muestras fue de 24 explantes. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple para muestras compuestas, y se expresaron en porcentaje. De ellos, se presentan los que resultaron más representativos del comportamiento en cada caso.

RESULTADOS

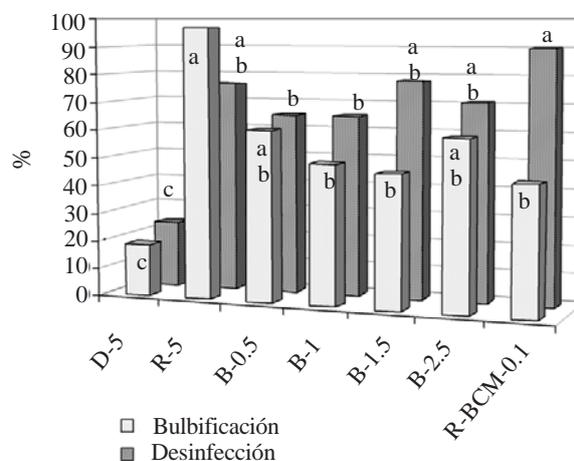
Tipos de explante y desinfectantes

Los resultados obtenidos para la desinfección de las plantas y su vigor se recogen en la Figura 1. Se observa que todos los tratamientos en que se eliminó una parte del diente, ya sea la base de contacto con el tallo o la hoja de reserva se lograron niveles notables de desinfección, con el mayor efecto para el tratamiento R-BCM 0.1 (eliminación de la base del diente, 0.1 % de bicloruro de mercurio).

El tratamiento en que sólo se eliminó la base del diente, y se aplicó hipoclorito al 5 % (R-5) también produjo una reducción notable de la contaminación en comparación con los dientes completos (D-5). El efecto de eliminación del tejido de la base del diente en la disminución de la contaminación puede explicarse considerando que esa zona tiene una estructura porosa propensa a la penetración del polvo y de los microorganismos del suelo. La concentración de hipoclorito al 5 % no resultó tóxica en este tratamiento, en el que la eliminación de la capa externa de la base del diente se produjo después de la exposición al desinfectante. Una concentración de hipoclorito similar (5.25 %) se utilizó con éxito para la descontaminación del bulbo de ajo con el objetivo de obtener semillas sintéticas (Bekheet, (2006), y en el desarrollo de un protocolo de micropropagación (Seif El-Nasr *et al.*; 2011).

Al evaluar el efecto de los tratamientos sobre el vigor (Figura 1), se encontró que, tanto en los tratamientos en que se retiró del explante la hoja de reserva, quedando como capa más externa la hoja de brotación (B) como en el que se utilizó el bicloruro de mercurio (BCM), se produjo la reducción del vigor, expresado en el porcentaje

de plantas que llegaron a bulbificar. También se observó reducción del grosor del tallo y clorosis de las hojas. El tratamiento R-BCM 0.1 fue el menos favorable, ya que resultó tóxico (a pesar de que las plantas conservaban la hoja de reserva), lo que se hizo evidente en que se redujo notablemente la altura y las plantas mostraron acentuada clorosis. Este resultado coincide con el efecto tóxico del bicloruro de mercurio, aún en muy bajas concentraciones, sobre el crecimiento de los ápices de ajo, referido por Izquierdo *et al.* (1998).



Bulbificación $S_x=9.4$; $CV=26.8$ Desinfección $S_x=10.6$; $CV=29.4$

Tratamientos

- D-5. Diente completo, hipoclorito de sodio al 5%
- R-5. Hoja de reserva eliminando 1 mm de la base del diente, hipoclorito de sodio 5 %.
- B. Hoja de brotación (sin la hoja de reserva), hipoclorito de sodio (0.5; 1.0; 1.5 y 2.5 %)
- R-BCM-0.1. Hoja de reserva -1 mm de la base del diente, bicloruro de mercurio al 0.1 %

Figura 1. Comportamiento de la desinfección y del vigor de las plantas (expresado en el porcentaje de bulbificación), para los diferentes tratamientos de desinfección. Clon *Quivicán*

De los resultados obtenidos se pudo resumir que, de los tratamientos analizados, el más favorable fue el R-5; ya que permitió obtener un grado de desinfección aceptable (en el entorno del 70 %), sin producir deterioro

de las plantas. No obstante, al probar este tratamiento con el clon Villa Clara, con un alto nivel de contaminación, el porcentaje de descontaminación no rebasó el 50 %; por ello con este clon se ensayaron otras variantes para reducir las contaminaciones.

Tiempo de desinfección

En las condiciones experimentales no resultó conveniente extender el tiempo de desinfección a 30 minutos, aún cuando el explante conservó la hoja de reserva (tratamiento R-5). La exposición prolongada al hipoclorito no redujo la contaminación, sin embargo resultó tóxica a los tejidos de modo que disminuyó el número promedio de raíces por planta y la bulbificación (Figura 2). Nevee *et al.* (2007) utilizaron el tiempo de 30 minutos, para la desinfección de bulbos de ajo con una solución de hipoclorito de sodio al 30 %. La diferencia de ese resultado con el obtenido en el presente trabajo, posiblemente está relacionada con las diferencias entre los clones y las dimensiones de los dientes. Los bulbos con hojas de reserva más gruesas pudieran tener los ápices de crecimiento más protegidos de la acción tóxica de los desinfectantes.

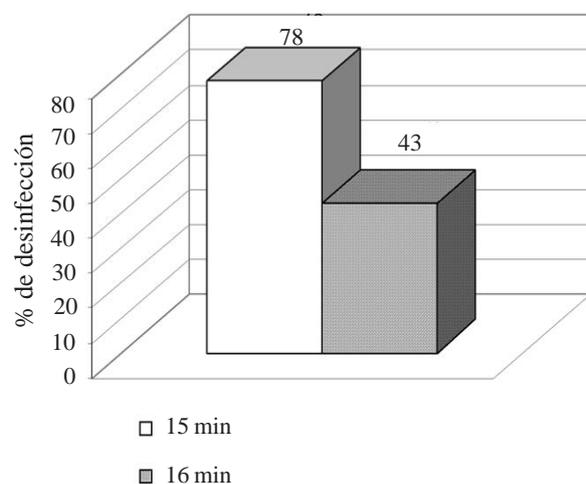
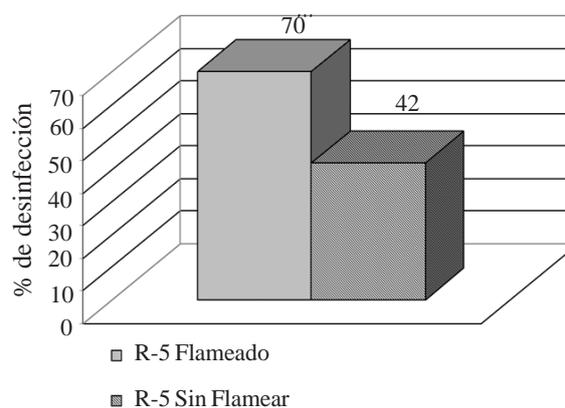


Figura 2. Efecto del tiempo de la desinfección con hipoclorito de sodio al 5% (tratamiento R-5) sobre la bulbificación, como indicador del vigor de las plantas después del tratamiento. Clon Quivicán

Flameo del explante

La Figura 3 compara el grado de desinfección logrado en el Clon Villa Clara cuando se aplicó el tratamiento R-5 y cuando a este tratamiento se le adicionó un flameo ligero de la base del diente (R-5F). Este clon presentó un nivel de contaminación alto, ya que con el tratamiento R-5 el porcentaje de desinfección no alcanzó el 40 %. Como puede verse, en este caso, el flameo del diente fue un aspecto adicional que contribuyó a aumentar la desinfección.

El procedimiento de desinfección R-5F se aplica para la conservación de ajo por reducción de la tasa de crecimiento en el Banco de Germoplasma del INIFAT, que conserva clones seleccionados, obtenidos por mejoramiento genético o provenientes de las regiones productoras más importantes del país (Torres *et al.*, 2008).



R-5: Hoja de reserva con la eliminación de la base del diente, hipoclorito de sodio al 5%

Figura 3. Porcentaje de desinfección obtenido al adicionar al tratamiento R-5 un flameo ligero. Clon Villa Clara

CONCLUSIONES

- El procedimiento consistente en aplicar hipoclorito de sodio al 5 % durante 15 minutos; seguido de eliminar aproximadamente 1 mm de la capa más externa

y flamear ligeramente la base del diente produjo niveles aceptables de desinfección de los bulbos de ajo, con niveles en el entorno del 70 %, sin producir deterioro de las plantas.

- La extensión del tiempo de desinfección hasta 30 minutos, la eliminación de la hoja de reserva o la aplicación del bicloruro de mercurio al 0.1 % afectaron el vigor de las plantas durante su desarrollo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bekheet, S.A. A synthetic seed method through encapsulation of *in vitro* proliferated bulblets of garlic (*Allium sativum* L.). Arab J. Biotech. 2006, Vol. 9 (3): 415-426.
- Burba, J.L. Los grupos varietales del ajo (*Allium sativum* L.). Contribución para su entendimiento. Horticultura Argentina. 2008, 27(62): 20-27.
- ECP/GR Working group on *Allium*. 2006. Progress report for the period 2003-2006. http://www.ecpgr.cgiar.org/SteeringCommittee/SC10/StandRep/Allium_standrep.pdf: 21 de septiembre del 2009.
- 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 Symp. Edible Alliaceae SecIL: Burba and C.R. Galmarini Acta Hort. 433.ISHS 1997.
- Kim, H.H.; Lee J. K.; Hwang, H.S. and F. Engelmann. 2007. Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique. CryoLetters 28 (6), 471-482.
- Hassan, N. A.; A. A. El-Halwagi; A. Gaber; M. Al-Awady y A. Khalaf. 2007. Slow growth *in vitro* conservation of garlic cultivars grow in Egypt: chemical characterization and molecular evaluation. 2007. Global Journal of Molecular Sciences. 2 (2): 67-75.
- Izquierdo, H.; Disotuar, R.; Qiñonez Y.; y Bejerano, J. M. 1998. Efectividad de diferentes agentes químicos en la desinfección de *Allium sativum* L. para su implantación *in vitro* Taller Internacional «Geminivirus en el Caribe», La Habana, Cuba.
- 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.
- Muñoz, L.; L. Almaguel; M. Benítez; G Brito; I. Cáceres; J. J. Castellanos; S. Fraga; J. F. Gil; M. López; A. Prats. 2010. El cultivo y mejoramiento de la producción de ajo en Cuba. Agricultura Organica. 1: 18-21.
- Murashige, T.; F. Skoog,. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Neveen A. H.; A. A. El-Halwagi, A. Gaber, M. El-Awady y A. 2007. Khalaf. Slow-Growth *in vitro* conservation of garlic cultivars grow in Egypt. Global Journal of Molecular Sciences 2 (2): 67-75.
- Seif El-Nasr H. GadEl-Hak; , A. Z. Kasem ; M.M.M. Yasser y E. S. Asmaa. 2011. Growth and cytogenetical properties of micro-propagated and successfully acclimatized garlic (*Allium sativum* L.) clones with a modified shoot tip culture protocol. Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants 3 (2): 115-129.
- Shemesh, E; O.Scholten, H. D. Rabinowitch y R. Kamenetsky.2008. Unlocking variability: inherent variation and developmental traits of garlic plants originated from sexual reproduction. Planta.227(5):1013-1024.
- Stavilíková, H. 2008. Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection-Information. Hort. Sci. (Prague) 35 (3): 130-135.
- Torres M. A.; M. R. López, A. J. Rodríguez y M. Benítez. 2008. Conservación de germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.) por reducción de la tasa de crecimiento. Agrotecnia de Cuba. 32 (2):46-55.

Recibido: 8 de septiembre de 2011

Aceptado: 22 de marzo de 2012