

PROPAGACIÓN DE AJO (*Allium sativum* L.) A PARTIR DE MICROBULBILLOS CONSERVADOS *IN VITRO*

María de los Ángeles Torres, Ana Julia Rodríguez, Adriana Torres
y Odalys Llorente

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
E-mail: matorres@inifat.co.cu

RESUMEN

En el Banco de Germoplasma del INIFAT se ha trabajado, durante la última década, en la conservación *in vitro* del germoplasma de ajo por reducción de la tasa de crecimiento. En la actualidad, cuenta con una colección de clones de interés; que son conservados, en dependencia del genotipo, por ciclos que oscilan entre los 9 meses y un año. La micropropagación es una fase importante para la regeneración y el mantenimiento de los microbulbillos de ajo conservados *in vitro*, por lo que constituye uno de los aspectos a abordar en la conservación de su germoplasma. El objetivo de este trabajo es evaluar tres procedimientos (P1, P2 y P3) para la micropropagación de ajo tomando como explante ápices generados a partir de microbulbillos conservados *in vitro*; con vistas a regenerar y mantener los clones conservados por reducción de la tasa de crecimiento. Con el tratamiento 2 (P2) se ha obtenido una tasa de propagación aceptable a los objetivos del mantenimiento de la colección *in vitro* (a 5-6°C), con niveles de hiperhidricidad despreciables y sin afectar la estructura de las vitroplantas. El procedimiento 3 favoreció la formación de brotes múltiples y resulta recomendable para los clones que presenten baja respuesta al tratamiento P 2.

Palabras claves: ajo, propagación, microbulbillos

PROPAGATION OF GARLIC (*Allium sativum* L.) FROM *IN VITRO* CONSERVED BULBLETS

ABSTRACT

During the last decade, slow growth conservation of garlic germplasm has been studied at INIFAT's Gene Bank. At present, the Gene Bank has a collection of clones that are conserved, depending on the genotype, from 9 months to one year regeneration cycles. Micropropagation is an important phase for regeneration and management of *in vitro* conserved garlic bulblets; that is why, it is one of the aspects to study for garlic germplasm conservation. The objective of this paper is to evaluate three procedures (P1, P2, P3) for garlic micropropagation using *in vitro* conserved bulblet apices as explants; with the purpose of regenerating and maintaining slow growth conserved clones. With treatment 2 (P2) was obtained an acceptable propagation rate for maintaining the *in vitro* collection (at 5-6°C). Procedure 3 favored multiple shoots formation and it is recommendable for clones of low propagation rate with P 2.

Key words: garlic, propagation, bulblets

INTRODUCCIÓN

El ajo es una especie ampliamente utilizada tanto por sus atributos culinarios como medicinales. En los últimos años se ha producido un crecimiento de su producción mundial, tanto en toneladas como en área cultivada (Fundación ProMendoza, 2004). En países como los Estados Unidos de América, el cultivo del ajo se ha popularizado en los años recientes, debido al

conocimiento de los muchos beneficios que su consumo proporciona a la salud; con precios estimados para el mercado de campesinos entre \$5 y \$10 por libra (Rosen et al., 2008).

El ajo cultivado es una planta estéril que sólo se propaga asexualmente (Rabinowitch y Kamenetsky, 2004). A nivel mundial el apreciado pool genético de esta especie se encuentra amenazado por la rápida sustitución de los clones tradicionales por cultivares modernos del grupo *Sativum* (Kamenetsky et al., 2005). Su germoplasma se conserva mediante colecciones de campo o por métodos biotecnológicos. En el Banco de Germoplasma del INIFAT se ha trabajado durante los últimos 10 años en la conservación de germoplasma de ajo por reducción de la tasa de crecimiento (Torres, 2006; Torres et al., 2007), y en la actualidad se cuenta con una colección de clones de interés; los que son conservados, en dependencia del genotipo, por ciclos que oscilan entre los 9 meses y un año.

La micropropagación es una fase indispensable para la regeneración y el mantenimiento de los microbulbillos de ajo conservados *in vitro*, por lo que constituye uno de los aspectos a abordar en la conservación de su germoplasma.

Aunque existen trabajos previos sobre la temática en el país tomando como explantes ápices de bulbos (dientes), en este caso el material biológico son microbulbillos conservados *in vitro*; además, es necesario enfocar la propagación hacia el objetivo de la conservación, en la que no se requiere de un gran número de plantas en subcultivos múltiples, sino de un total de plantas que permitan mantener el número de réplicas que componen la entrada, empleando un mínimo de subcultivos.

Otro aspecto a tener en cuenta, es disminuir en las plantas micropropagadas la incidencia de la hiperhidricidad, desorden fisiológico al que las *Alliaceae* muestran susceptibilidad, y que se ha observado con frecuencia en los ensayos sobre conservación *in vitro* de ajo, realizados en el INIFAT (Torres et al., 2007).

El objetivo de este trabajo es determinar un tratamiento adecuado para la propagación de microbulbillos de ajo, con vistas al mantenimiento de las entradas de una colección conservada por reducción de la tasa de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como explantes se tomaron los brotes de los microbulbillos que, durante la conservación a 5-6°C, emergieron espontáneamente, una vez que alcanzaron una altura aproximada de 5 cm o más. Para su extracción se realizó un corte longitudinal al microbulbillo, desbastando parte de su estructura, pero cuidando de no dejar al descubierto el de brote en crecimiento. El tamaño del explante fue de 5 a 8 mm de altura y 5 mm de diámetro, aproximadamente. Se trabajó con el clon Criollo, procedente de la provincia La Habana y los clones obtenidos por mejoramiento genético L8, L12 y L26.

Tratamientos de micropropagación

Procedimiento 1 (P1).

Después de la extracción, los explantes se colocaron en medio Dunstan y Short (1977) (BDS) con 50 µM de 6-bencil-amino purina (BAP) (Keller y Fritsch, 1997). Al mes se transfirieron al mismo medio con 100 µM de BAP, por el mismo período (Keller y Lessemann, 1997).

Procedimiento 2 (P2).

Los explantes se cultivaron en medio Lismaier y Skoog (1965) (LS) con 1µM de ácido indolacético (AIA) y 1µM de BAP, por un mes; y a continuación, se transfirieron al medio LS modificado en la concentración de nitrato/amonio de la proporción de 40/20 (del medio

Murashige y Skoog, 1962) a la relación 56.5/3.5; y como reguladores 5µM de ácido naftalén acético (ANA) y 10µM de BAP, por un período similar (Nagakubo *et al.* 1997).

Procedimiento 3 (P3).

Los explantes se colocaron en el medio LS con 14.7 µM de N⁶-(2-isopentenil) adenina (2ip) + 1.6µM de ANA (Conci, 2004).

Los componentes que caracterizan los métodos ensayados se resumen en la Tabla 1.

Tabla1. Componentes que caracterizan los tratamientos ensayados.

Composición del medio	Procedimientos				
	P 1		P 2		P 3
	Keller y Fritsch, 1997 (medio 1)	Keller y Lessemann, 1997 (medio 2)	Nagakubo <i>et al.</i> , 1997 (medio 1) (medio 2)		Conci, 2004
Reguladores	50µM BAP	100µM BAP	1µM AIA + 1µM BAP	5µM ANA + 10µM BAP	14.7µM de 2ip+1.6µM de ANA
Medio Basal	BDS	BDS	LS	LS	LS
Relación nitrato/ amonio	40/20	40/20	40/20	56.5/3.5	40/20

Las plantas se evaluaron semanalmente. Al mes de la transferencia al último medio (de cada tratamiento), se cuantificó el porcentaje de plantas propagadas (respecto al total de las plantas tratadas) y la tasa de propagación promedio (número total de plántulas obtenidas/número de plantas progenitoras).

RESULTADOS

Como puede observarse en la Tabla 2, la tasa de propagación obtenida con el procedimiento 1 (P 1), fue la más alta entre los tratamientos. Sin embargo, al aplicar este tratamiento a diferentes clones, se observó que las vitroplantas desarrollaron una estructura no característica, mostrando el alargamiento del tallo (Figura 1), el cual en la vitroplanta normal mantiene una estructura de disco similar a la de la planta de campo. La estructura observada con esta concentración de reguladores guarda una notable similitud con la vara floral (denominada escapo) y la estructura globosa (contenitiva de los bulbillos) característica de los ecotipos de ajo denominados de "cuello duro" (hardneck) cultivado en regiones de clima frío (Figura 2). Este hecho pudiera estar relacionado con la afirmación de Burba (2008) de que según las condiciones ambientales de cultivo o las temperaturas de almacenamiento de la "semilla" las variedades pueden producir los dos tipos de propágulos, y cita el ejemplo de los ajos "blancos", que generalmente en las condiciones de cultivo no producen vara floral, pero sí lo hacen en regiones muy frías. El desarrollo de esta estructura solo fue observada al aplicar este tratamiento, por lo que al parecer estuvo vinculada a las altas concentraciones de citoquinina (BAP).

Tabla 2. Tasa de propagación de los ápices de ajo obtenida mediante los diferentes tratamientos.

Clon	Procedimiento	Porcentaje de propagación	Tasa de propagación
Criollo	P 1	100	4.5
Criollo	P 2	40	2.9
Criollo	P 3	33,4	3.9
L8	P 2	37.0	1.5
L8	P 3	69.2	3.8
L12	P 3	80.7	3.6
L26	P 3	62.5	3.2

Leyenda:

P 1: 50 μM de BAP por un mes (Keller y Fritsch, 1997), seguido de 100 μM de BAP, por igual período (Keller y Lessemann, 1997)

P 2: 1 μM de AIA +1 μM de BAP por un mes, seguido de 5 μM de ANA +10 μM BAP (Nagakubo *et al.*, 1997)

P 3: 14.7 μM de 2ip + 1.6 μM de ANA (Conci, 2004).

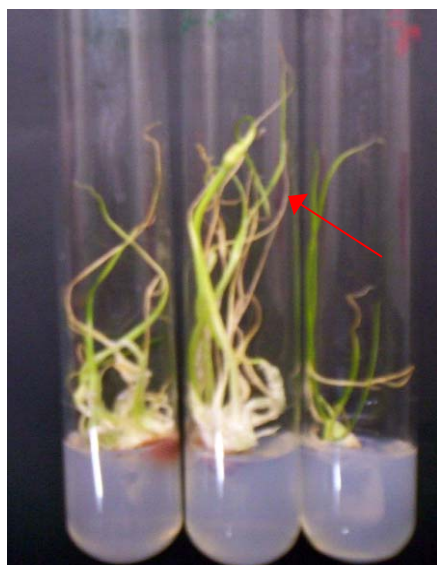


Figura 1. Plantas de ajo micropropagadas con el procedimiento 1 (P1; 50 μM de BAP, seguido de 100 μM de BAP, en subcultivos de un mes).

(←) Indica la estructura similar a la vara floral de los clones de “cuello duro



Figura 2. Tipo de ajo conocido como “hardneck” (cuello duro) que desarrolla la vara floral y la estructura globosa contentiva de pequeños bulbillos (Fuente: Hannan y Sorensen, 2001)

Con el tratamiento 2 (P 2) se observó una tasa de propagación relativamente baja (1.5 y 2.9). En este caso se observó (en forma paulatina) el desarrollo de los nuevos brotes a partir de la base de las hojas, lo que hace suponer que se trata del desarrollo de las yemas axilares

preexistentes (Figura 3). Las plantas mantuvieron el fenotipo normal de las vitroplantas de ajo, manteniendo la estructura característica del tallo y buena viabilidad.

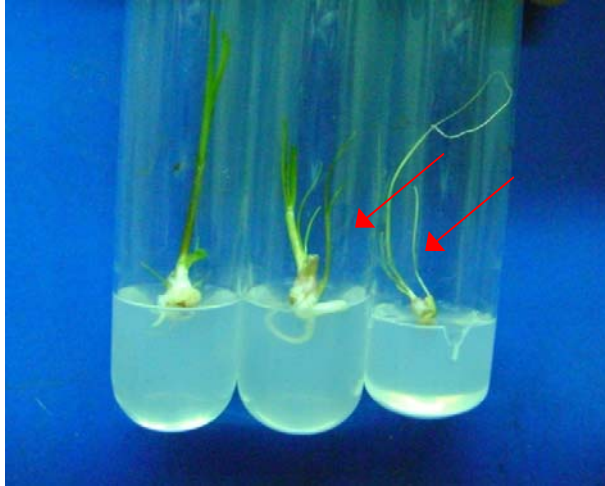


Figura 3. P2: 1 μ M de AIA +1 μ M de BAP por un mes, seguido de 5 μ M de ANA +10 μ M BAP (Nagakubo *et al.*, 1997)

(←) Indica el crecimiento de las nuevas plantas de la base de las hojas de la planta madre.

La manifestación de la hiperhidricidad se observó sólo en algunos ápices, lo que resultó en un nivel despreciable. En este caso, dado que la micropropagación se realiza con el objetivo de regenerar la muestra conservada *in vitro*, no se requiere de un alto índice de propagación, ni es deseable un alto número de subcultivos que pudieran favorecer la aparición de variaciones somaclonales. Según Nagakubo *et al.* (1997) en este método a la acción de los reguladores se suma el efecto del incremento en la relación nitrato/amonio, que además de disminuir la hiperhidricidad, estimula la micropropagación. Luciani *et al.* (2000) también encontraron influencia del incremento de la relación nitrato/amonio en el medio de cultivo, sobre la micropropagación de las plantas.

El procedimiento 3 (P 3) produjo el desarrollo brotes de neoformación en la base del tallo de las vitroplantas, y con él se obtuvo mayor tasa de propagación para los clones Criollo y L8 que la obtenida con el procedimiento 2; además, las vitroplantas mantuvieron su estructura característica, sin que se observara la presencia de la hiperhidricidad (Figura 4).

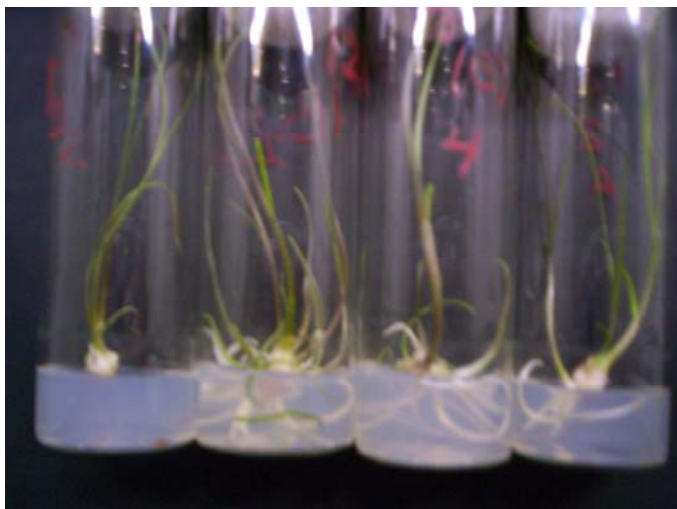


Figura 4. P3: 14.7 μ M de 2ip + 1.6 μ M de ANA (Conci, 2004)

En este trabajo se utilizaron como explantes, ápices de tamaño entre 5 y 8 mm, y no meristemas como publicaron Nagakubo *et al.* (1997), ya que en estos experimentos se utilizó como material biológico accesiones conservadas *in vitro*, por lo que se contó con un número limitado de explantes. Por otra parte, al partir de explantes de mayor tamaño, es posible que la tasa de propagación sea menor que la obtenida por Nagakubo *et al.* (1997) que reportan la obtención de brotes múltiples.

Los resultados obtenidos indican que, en las condiciones ensayadas (tipo de explante, genotipos) no resultó aconsejable la aplicación del procedimiento P 1. El tratamiento P 2, aunque resultó adecuado para el clon "Criollo" fue menos efectivo que el tratamiento P 3, en cuanto al valor de la tasa de propagación.

Actualmente, estos tratamientos se están evaluando en un mayor número de clones, ya que los resultados obtenidos hasta el momento indican diferencias en la respuesta entre los genotipos. La experiencia obtenida en los experimentos realizados indica que si bien sería deseable una tasa de propagación mínima de 2, no es conveniente una tasa superior a 4, ya que cuando se generan muchas plantas, con frecuencia alcanzan menor vigor, lo que puede redundar en bulbillos pequeños de menor viabilidad durante el próximo ciclo de conservación. La definición de esta respuesta en al menos dos ciclos de cultivo, permitiría determinar la combinación de reguladores más adecuada en cada caso.

CONCLUSIONES

En las condiciones ensayadas (tipo de explante, genotipos) no resultó aconsejable la aplicación del tratamiento 1 (P1: 50 μ M de BAP, seguido de 100 μ M de BAP).

Con el procedimiento 2 (P 2: 1 μ M de AIA + 1 μ M de BAP, seguido de 5 μ M de ANA +10 μ M BAP; manteniendo una relación nitrato/amonio de 56.5/3.5) se ha obtenido una tasa de propagación aceptable a los objetivos del mantenimiento de una colección *in vitro* (a 5-6°C), con niveles de hiperhidricidad despreciables y sin afectar la estructura de las vitroplantas.

El procedimiento 3, consistente en 14.7 μ M de 2ip + 1.6 μ M de ANA, descrito por Conci (2004), favoreció la formación de brotes múltiples y resulta recomendable para los clones que presenten baja respuesta al tratamiento P 2.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burba, J. L. 2008. Los grupos varietales del ajo (*Allium sativum* L.). Contribución para su entendimiento. Horticultura Argentina: 27(62) 20-27.
- Conci, V. 2004. Micropropagación de plantas. Protocolos Redbio/Fao. Especie *Allium sativum* (ajo). http://www.redbio.org/protocolos/pro_ajo.htm: 7 de mayo del 2008
- Dustan D. I. y K. C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70-72.
- Fundación ProMendoza. 2004. Informe Situación Mundial del Ajo Marzo de 2004: www.promendoza.com/new/espanol/interna/infoes: 17 de marzo 2008.
- Hannan, R. M. y E. J. Sorensen 2001. Crop profile for Garlic in Washington http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=153129.
- Kamenetsky, R.; I. London- Shafir ;F. Khassanov; C. Kik; A. W. Van Heusden; M. Vrieling-Van Ginkel; K. Burger-Miejer; J. Auger; I. Arnault y H.D. Rabinowitch. 2005. Diversity in fertility potential and organo-sulphur compounds among garlics from Central Asia. *Biodiversity and Conservation.* 14: 281-295.

- Keller E. R. J., Lessemann D-E, 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. 433.141-150.
- Keller J. y R. Fritsch (1997): Establishment of *in vitro* clones in the Gatersleben garlic collection. Actas Etnobotánica. 92: 155-161.
- Linsmaier E. M. y F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18, 100-127.
- Luciani, G. F.; P.H. Marinangeli y N. R. Curveto. 2001. Increasing nitrate/amonium ratio for improvement of garlic micropropagation. Scientia Horticulturae, Vol. 87, N° 1-2, 11-20.
- Nagakubo T., M. Takaichi y K. Okeda. A. (1997): Micropropagation of *Allium sativum* L. (garlic). En: Biotechnology and Agriculture Forestry. Vol. 39. high Tech and Micropropogación V. (ed. By Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg).
- Rabinowitch, H. y R. Kamenetsky. 2004. Mystery of sterility of the garlic plant solved by Hebrew University researches. Science Daily. www.sciencedaily.com/releases/2004/09/040903093636.htm, 2004: 26 de abril del 2007.
- Rosen, C.; R. Becker; V. Fritz; B. Hutchison; J. Percich; C. Tong y J. Wright. 2008. Growing garlic in Minnessota (*Allium sativum* L.) Vegetable Crop Management. <http://www.extension.vmn.edu/distribution/cropsystems/DC7317.html>: 5 de mayo del 2009.
- Torres, M. A. 2006. Conservación alternativa de semilla de ajo por métodos biotecnológicos. Informe Final del Proyecto 1806 del Programa Ramal Producción Nacional de Semillas. 52p.
- Torres, M.A.; A. Font; O. Llorente; V. Moreno y A. J. Rodríguez. 2007. Estrategias para la conservación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) en Cuba. Convención Trópico 2008. Ciudad de La Habana, Cuba. 866-878.