

CRIOCONSERVACIÓN DE AJO (*Allium sativum* L.) MEDIANTE LA VITRIFICACIÓN DE ÁPICES.

Maria de los A. Torres y Ana Font.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)

e-mail: matorres@inifat.co.cu

RESUMEN

En el Banco de Germoplasma del INIFAT se trabaja en la conservación *in vitro* de ajo con el objetivo de rescatar y preservar su variabilidad. Como parte de esta investigación, este trabajo ofrece los resultados sobre la crioconservación de los ápices de los bulbos (dientes). La crioconservación se desarrolló mediante la vitrificación con la solución PVS3 (50% glicerol + 50% sacarosa), durante 3 horas. Se encontró que la cantidad de ápices que continuaron el crecimiento después de la crioconservación fue alto (98.4%). A los 3 meses de la vitrificación, el 68.3% de los ápices habían desarrollado vitroplantas que completaron su desarrollo y comenzaron a producir microbulbillos, con una frecuencia similar al testigo. Se evaluó el efecto de la hiperhidricidad. A los 4 meses, el 85.7% de las plantas evolucionaron a microbulbillos de diámetro variable entre los 2 y 5 mm. Estas plantas han mantenido su desarrollo y viabilidad, lo que ofrece una perspectiva favorable para el incremento del diámetro de los bulbillos.

Palabras Claves: ajo, crioconservación, hiperhidricidad.

ABSTRACT

GARLIC (*Allium sativum* L.) CRYOPRESERVATION BY VITRIFICATION OF APICES.

A research has been developed at INIFAT's Gene Bank for garlic *in vitro* conservation with the purpose of recovering and preserving its variability. As a part of this research, this paper offers the results of the cryopreservation of clove apices. Vitrification with PSV3 solution (50% glycerol + 50% sucrose), during 3 hours, was the cryopreservation protocol. It was observed that a high quantity of apices (98.4%) continue growing after cryopreservation. Three months after vitrification, 68.3% of apices developed plantlets that completed their development, and produced bulblets in a frequency similar than the control treatment. Hyperhydricity effect on plant development was evaluated. Four months after cryopreservation, 85.7% of plants evolved to bulblets of diameter from 2 to 5 mm. Plants have maintained the growth and viability. This fact offers a favorable perspective to bulblets diameter increase.

Key words: garlic, cryopreservation, hyperhydricity.

INTRODUCCION.

En Cuba, el ajo es un condimento de alto consumo. En el presente, está entre las hortalizas más cotizadas. Por otra parte, se le atribuye un efecto preventivo de las enfermedades cardiovasculares, las cuales son de alta prioridad para la salud pública nacional. Sin embargo, la poca variabilidad clonal en la producción, unido a otros factores como su reproducción vegetativa y ciclo corto, los riesgos al ataque de los virus y al estrés climático; así como, el alto costo y la labor intensiva que requiere el mantenimiento de las colecciones de campo, ponen en alto riesgo la conservación del germoplasma existente en el país. Este hecho ha motivado que en el Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) se haya venido trabajando en evaluar la factibilidad de la crioconservación de ajo, como una forma complementaria de conservación de su germoplasma.

MATERIALES Y METODOS.

Material vegetal, desinfección y estimulación del explante

Se trabajó un clon tipo criollo, colectado en la localidad de Güira de Melena, provincia La Habana.

Los dientes se desinfectaron con alcohol al 70% por un minuto y a continuación con hipoclorito de sodio al 5%, durante 15 minutos. Además, se les eliminó la parte externa de la base (zona más propensa a la penetración de los microorganismos) y se les realizó un ligero flameo. Posteriormente, se colocaron medio MS sin hormonas (Murashige y Skoog, 1962), con el objetivo de estimular el ápice de crecimiento y descartar los bulbos contaminados. El crecimiento de las hojas internas del diente se observó en un término aproximado de una semana.

Una vez germinados los dientes, se extrajeron los ápices, de tamaño aproximado entre los 3 y 4 mm, formados por el ápice de crecimiento y los primordios foliares, y manteniendo parte de la base del diente.

Protocolo de crioconservación.

Para la crioconservación se utilizó el protocolo de vitrificación según el procedimiento descrito por Makowska *et al.* (1999). Después del corte, los ápices se mantuvieron hasta el día siguiente en el medio MS + 0.1 mg.l⁻¹ de ácido indolacético y 0.1 mg.l⁻¹ de kinetina (a la temperatura de 25°C). A continuación, se colocaron en crioviales de 1.8 ml y se trataron con una solución de 2 M glicerol + 0.4 M sacarosa, por 20 minutos; a la temperatura ambiente de 25°C. Esta solución se reemplazó con 1ml de la solución de vitrificación PVS3 (50 % glicerol + 50 % sacarosa) y el vial se agitó muy ligeramente, de modo que los ápices quedaran cubiertos y se dejaron en ella por un período de 3 horas, para provocar la deshidratación. Posteriormente, la PVS3 se renovó nuevamente (volumen, 1ml) y los crioviales se sumergieron en nitrógeno líquido (-196°C), por 2 horas. La transferencia posterior a la temperatura ambiente se realizó sumergiendo el criovial, con agitación vigorosa, en un baño de agua a la temperatura de 40°C, por 80 segundos. Seguidamente, se extrajo la solución PVS3 y los ápices se lavaron con 1.5 ml de una solución del medio MS con 1.2 M de sacarosa, por un período de 10 min. Se utilizaron 8 réplicas de 5 ápices por criovial. Los valores se expresaron en porcentaje. Los resultados se compararon con un testigo que recibió igual tratamiento exceptuando la inmersión en nitrógeno líquido.

Recultivo. Los ápices se colocaron en medio Linsmaier y Skoog (LS) (1965) con 0.3 M de sacarosa y finalmente se pasaron a medio LS con proporción nitrato/amonio de 56.5/3.5, para contrarrestar la hiperhidricidad (Nagakubo *et al.*, 1993). El contenido de sacarosa del medio fue el estándar (3%).

Un mes después del recultivo se evaluaron la supervivencia y la regeneración de las plantas, la altura (en mm), el número de hojas, la hiperhidricidad, el número de raíces y la contaminación. Para evaluar la hiperhidricidad se establecieron 3 grados: 0) no se manifiesta engrosamiento de los tejidos y el ápice es fototrópico; 1) la hoja externa presenta curvatura o aspecto suculto, pero el ápice es fototrópico y mantiene su textura; 2) la hoja externa se presenta con curvatura o aspecto suculto y el ápice manifiesta retardo en su desarrollo.

A los 4 meses del tratamiento, se evaluó el diámetro de los bulbillos (en mm). La evaluación se realizó en una muestra de 40 ápices. Los datos de porcentaje fueron transformados ($x = 2 \arcsin p^{1/2}$) para el cálculo de la media y la desviación estándar. Para la comparación del diámetro de los bulbillos se utilizó una prueba t- Student, para tamaño desigual de muestras (Lerch, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSION.

El Cuadro 1 resume los resultados de supervivencia al mes del tratamiento y la evaluación de las plantas en dos etapas de su desarrollo. En ella se observa que la cantidad de ápices que continuaron el crecimiento después de la crioconservación fue alta (98.4%).

Cuadro 1. Supervivencia y desarrollo de los ápices de ajo, regenerados de la crioconservación, hasta los 4 meses posteriores al tratamiento (Los valores se expresan en porcentaje).

	Supervivencia (1mes)*	Plantas que completaron su desarrollo (3 meses)	Plantas que bulbificaron/plantas desarrolladas. (4 meses)
Crioconservados	98.4 ± 2.5	68.3 ±15	85.7
Testigo	100	77.7 ±32	85.5

* El valor entre paréntesis expresa el tiempo transcurrido después de la crioconservación.

A los 3 meses de la crioconservación, el 68.3% de los ápices habían desarrollado vitroplantas que completaron su desarrollo y comenzaron a producir microbulbillos, con una frecuencia similar al testigo. A los 4 meses, el 85.7% de las plantas evolucionaron, como fase natural del desarrollo, a microbulbillos de diámetro variable entre los 2 y 5 mm; lo que indica que las plantas siguieron, aproximadamente, el ciclo biológico propio del cultivo.

En parte de los ápices que sobrevivieron (tanto de los crioconservados como en los del tratamiento testigo) se presentaron síntomas hiperhidricidad. Este desorden se manifestó con síntomas ligeros (grado 1). No obstante, se pudo observar que el engrosamiento de la hoja externa no necesariamente produjo daño directo del ápice de crecimiento, aunque en ocasiones se convirtió en una barrera física que limitó su desarrollo. Ese retardo en el desarrollo de las plantas (expresado en la altura) también se manifestó en la reducción de las dimensiones del microbulbillo, que se cuantifica en un menor porcentaje de bulbillos que alcanzaron un diámetro igual o superior a los 4 mm (Cuadro 2).

Cuadro 2. Influencia de la hiperhidricidad en la reducción de la altura de las plantas y el diámetro de los microbulbillos regenerados a partir de ápices de ajo crioconservados.

	Altura de la planta (mm)	Bulbillos con diámetro de 4 mm o más (%)
Plantas sin hiperhidricidad	78.6	84.6
Plantas con síntomas de hiperhidricidad	61.8	36.4

Por otra parte, los explantes que manifestaron síntomas ligeros de hiperhidricidad (grado 1) y que recuperaron su apariencia y crecimiento normal espontáneamente, dieron lugar a plantas de características similares a las que no manifestaron este desorden (Cuadro 3). Así mismo, en las plantas en las que el engrosamiento de la hoja externa constituía una barrera física al crecimiento del ápice, se procedió a eliminar el tejido hiperhídrico a su alrededor, lo que permitió la continuidad del desarrollo de las plantas hasta la bulbificación.

Cuadro 3. Desarrollo de las plantas (dado por las dimensiones de los microbulbillos y la emisión de raíces) en relación con los síntomas de la hiperhidricidad y la eliminación del tejido hiperhídrico.

	Proporción del total de plantas que bulbificaron. (%)	Diámetro promedio de los microbulbillos. (mm)	Proporción de plantas enraizadas. (%)
Plantas sin hiperhidricidad	26.7	4.38 ± 0.5	50.0
Plantas con síntomas que se recuperaron espontáneamente	20.0	4.5 ± 0.5	60.0
Plantas a las que se le eliminó el tejido hiperhídrico externo	53.3	3.6 ± 1.0	58.3

Como se observa, las plantas a las que se le eliminó el tejido hiperhídrico, tuvieron un valor promedio del diámetro de los microbulbillos ligeramente menor que el resto, aunque esta diferencia no sea de valor estadístico. En este caso, el mayor valor de la desviación estándar (± 1.0) está dado por una mayor dispersión del valor del diámetro del microbulbillo, ya que, si bien algunas plantas desarrollaron bulbillos de 4 mm o más, otras desarrollaron microbulbillos pequeños (menores de 3 mm). Posiblemente, este efecto pudiera evitarse si la eliminación del tejido hiperhídrico se realiza en una etapa temprana del desarrollo de las plantas.

De modo general, el diámetro de los microbulbillos obtenidos es pequeño, resultado que coincide con los obtenidos por otros autores (Keller, 2005; comunicación personal), lo que constituye un aspecto no favorable para la regeneración de plantas viables una vez terminado el período de conservación. El aumento de las dimensiones de los microbulbillos pudiera ser estimulado colocando los ápices después del recultivo en medio enriquecido en sacarosa, ya que el efecto de la sacarosa en la estimulación de la bulbificación del ajo es bien conocido (Keller y Fritsch, 1997; Izquierdo *et al.*, 2002; Mujica y Mogollón, 2004; Torres, M. A., 2006).

Con el objetivo de evaluar esta posibilidad se realizó un experimento similar con la única diferencia de que, después del recultivo en medio LS con proporción nitrato/amonio de 56.5/3.5 (para contrarrestar la hiperhidricidad) los ápices se transfirieron a medio MS enriquecido con sacarosa al 15%. Sin embargo, a pesar de que se obtuvieron ápices de diámetro superior a los 5 mm, se encontró una alta dispersión en el diámetro, por lo que resultados no fueron concluyentes.

Al evaluar la ocurrencia de la hiperhidricidad, George (1993) plantea que “el grado la susceptibilidad y la apariencia de los tejidos afectados no sólo varía de acuerdo a la familia de la planta que está siendo cultivada, sino que también depende de la naturaleza del cultivo. Ápices con diferente grado de vitrescencia son encontrados frecuentemente en el mismo vaso de cultivo y dentro de diferentes vasos del mismo cultivo”. En estos trabajos las

plantas se identificaron de acuerdo al criovial en el que fueron crioconservadas, y se pudo apreciar el mismo comportamiento citado anteriormente (George, 1993) tanto para la manifestación de la hiperhidricidad como para la ocurrencia de los microbulbillos de talla pequeña (menos de 3 mm). Además, las diferencias entre las plantas, en cuanto a la talla de los microbulbillos, no se observó solamente en el material crioconservado, sino que también se manifestó entre las plantas del tratamiento testigo (no se muestran los datos), de lo que puede inferirse que este hecho no está vinculado directamente a la crioconservación en sí. Posiblemente, sea necesario centrar la atención en aspectos del material biológico, ya sea las características de los bulbos (dientes) que aportan el explante, o las características del explante en sí mismo, ya que todos los ápices no tienen el mismo desarrollo de los primordios foliares al momento de su extracción.

No obstante, el diámetro de los bulbillos superior a 4 mm (obtenido como valor promedio para las plantas que no mostraron síntomas de hiperhidricidad, o que se recuperaron espontáneamente) está en el rango considerado aceptable para la aclimatación, según la metodología desarrollada por EMBRAPA, para la producción *in vitro* de semilla de ajo libre de virus (Torres *et al.*, 2001).

El desarrollo de raíces en una etapa posterior a la bulbificación puede ser un indicador de la continuidad de la viabilidad de las plantas, dada por la generación de nuevos tejidos, en correspondencia con las diferentes fases de su desarrollo en condiciones *in vitro*, y contribuye a aumentar la absorción de los nutrientes del medio, lo que constituye un aspecto a favor de los tratamientos dirigidos a aumentar el vigor de los microbulbillos.

CONCLUSIONES

Los ápices crioconservados con la solución PVS3, por 3 horas, llegaron a completar su desarrollo *in vitro* hasta la bulbificación sin diferencias respecto al testigo.

Se observó la manifestación de la hiperhidricidad, predominantemente con síntomas ligeros. Las plantas que se recuperaron espontáneamente, desarrollaron microbulbillos de talla similar a las que no manifestaron los síntomas. En parte de las plantas fue necesario eliminar el tejido hiperhídrico para permitir el crecimiento de los ápices, y en ellas se encontró menor valor del diámetro promedio de los microbulbillos.

Los resultados de este trabajo aportan información, en cuanto al desarrollo de las plantas después de la crioconservación y cómo este desarrollo puede ser afectado por la hiperhidricidad. También, indica que, cuando los síntomas son ligeros, las plantas pueden recuperarse y que la eliminación del tejido hiperhídrico también puede contribuir a la recuperación de su crecimiento. Estos elementos constituyen una contribución al conocimiento sobre las posibilidades de aplicación de este protocolo en las condiciones del Banco de Germoplasma del INIFAT.

REFERENCIAS

- George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd. England, 574 p.
- Izquierdo, H.; Y. Quiñónez; R. Disotuar y D. Pedroso. 2002. Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatación de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium salivum* L.). Cultivos Tropicales. Vol. 23. no. 3 p. 63-69.
- Keller, J. y R. Fritsch. 1997. Establishment of *in vitro* clones in the Gatersleben garlic collection. Actas Etnobotánica 92: 155-161
- Lerch G. 1977. La Experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Editorial Científico Técnica, La Habana, 452 p.
- Linsmaier E. M. y F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18, 100-127.

- 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.
- Mujica, H. y N. Mogollón. 2004. Bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citoquininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*. (on line). Vol. 16. No.1 p. 55-60. ISSN 1316-3361. 2004.
- Murashige, T.; F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagakubo T.; A. Nagasawa y H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 175-183, 1993.
- Torres, A. C.,; A. Napomuceno; R. De Olivera; J. Amauri. 2001. Produção de Alho-Semente con Alta Qualidade Fitosanitaria Mediante Cultura de Ápices Caulinares. Circular Técnica 27. Embrapa. 8 p.
- 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.