

CONSERVACIÓN DE SEMILLA DE AJO POR MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS.

Maria de los A. Torres¹, Ana Font¹, Manuel R. López², Ana Julia Rodríguez¹, Amelia Capote¹ y Odalys Llorente¹.

¹Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)

²Unidad de Semillas y Extensiones de Banao, Sancti Spíritus, (INIFAT).

e-mail: matorres@inifat.co.cu

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es muy apreciado por su valor como condimento y sus propiedades medicinales. En Cuba, la labor de la conservación de su germoplasma se ha desarrollado de la manera tradicional, lo que expone las colecciones a numerosos factores externos que las han conducido a una considerable erosión. La conservación *in vitro* mediante la reducción de la tasa de crecimiento es una forma viable para la conservación del germoplasma de esta especie. Se introdujeron *in vitro* 18 clones y se evaluó su desarrollo a la temperatura de 5-6°C, con un suplemento al medio de cultivo de sacarosa al 10-15%. Se evaluó la supervivencia de los bulbillos en la transferencia al suelo y la semilla obtenida se sembró en la próxima etapa, en condiciones de producción. La disminución de la temperatura de conservación hasta 5-6°C retardó notablemente el crecimiento, dado por la disminución del número de hojas y de raíces, la altura y la bulbificación de las plantas. Así mismo, los clones que se introdujeron en la baja temperatura sin precultivo previo, requirieron de mayor tiempo para que más del 50% de las plantas bulbificaran respecto a las que recibieron un precultivo a 24°C. La materia orgánica (humus de lombriz) resultó ser un sustrato apropiado para la siembra de los microbulbillos. Con este sustrato el desarrollo de las plántulas fue superior al 60%. Después de dos ciclos de cultivo en el suelo las plantas recuperaron sus características fenotípicas. La semilla recuperada tuvo un coeficiente de multiplicación de 20 a 30 dientes por bulbillito plantado.

Palabras claves: ajo, conservación *in vitro*, semilla.

ABSTRACT

GARLIC SEEDS CONSERVATION BY BIOTECHNOLOGICAL METHODS.

Garlic (*Allium sativum* L.) is very appreciated due to its value as a condiment and its medicinal properties. In Cuba, garlic germplasm conservation has been developed in traditional conditions. This fact has exposed garlic collections to many factors that has been lead them to a considerable erosion. Slow growth conservation is a viable method for garlic germplasm. The growth of 18 garlic clones at 5-6°C temperature, in a culture media supplemented with 10-15% sucrose, was evaluated. Bulblet survival to substrate acclimatization was tested and produced seeds were sowed in commercial production conditions. The decreases of conservation temperature until 5-6°C notably retard plant growth, expressed by a decrease of leave and root number, height and plant bulblet formation. Also, those clones that were conserved at low temperature without a previous preculture required a longer time for bulblet formation than plants precultured at 24°C. Organic fertilizer (earthworm humus) was an appropriated substrate for bulblet sowing. With this substrate plant development was higher than 60%. After two culture cycles in the soil, garlic plants recovered their phenotypical characters. Recovered seeds had a multiplication coefficient from 20 to 30 garlic cloves per each planted bulblet.

Key words: garlic, *in vitro* conservation, seed.

INTRODUCCIÓN

El ajo es un condimento indispensable en la cocina cubana. También se considera una planta medicinal, ya que posee notables propiedades terapéuticas. Se ha demostrado que es eficaz como antibiótico y en el control de enfermedades, tales como la arteriosclerosis, el

reuma y la hipertensión (Mansilla, 2002). En Cuba, su cultivo tiene altos requerimientos en cuanto a las atenciones culturales como el desyerbe, la fertilización, la aplicación de pesticidas y el riego. Dado el requerimiento del almacenamiento de la semilla agámica de un año a otro, los productores también están expuestos a la pérdida de las semillas. Posiblemente, tales exigencias han motivado que algunos productores hayan abandonado la producción (Moreno *et al.*, 2001). El INIFAT ha desarrollado una labor en su conservación mediante una colección de campo; la cual ha sido notablemente erosionada. Estos son los antecedentes que dieron origen a este trabajo.

MATERIALES Y METODOS.

Conservación a 5-6°C. Se trabajó con clones colectados en diferentes territorios del país, y clones derivados del trabajo de mejoramiento del INIFAT y de la colección de campo mantenida en la Unidad de Semillas y Extensiones de Banao (provincia de Sancti Spíritus). Los materiales se identificaron según su procedencia.

Los dientes de ajo previamente desinfectados (Torres *et al.*, 2006) se sembraron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin hormonas, para estimular su germinación. Posteriormente, se extrajeron los ápices de crecimiento en explantes de una altura de 1 cm y de 0.5 a 0.8 cm de diámetro, los que se sembraron en medio BDS (Dustan y Short, 1977), con sacarosa al 10-15% (Keller J. y R. Fritsch, 1997), y se conservaron a la temperatura de 5-6°C. Cada 15 días, se evaluó la altura (en 1, 2, 3, 4, 5 o más cm), la cantidad de hojas y de raíces de las vitroplantas (en número, con igual escala). De los microbulbillos, se cuantificó la ausencia o presencia y el grado de desarrollo (1: ≤0.5 cm; 2: 0.5-1cm; 3: ≥1cm de diámetro). El tamaño mínimo de las muestras fue de 24 plantas. A partir de las categorías descritas se calcularon los indicadores de desarrollo denominados índice foliar, índice radicular, índice de bulbificación y la altura, los que se calcularon según la relación.

Índice de desarrollo =
$$\frac{\text{\#de plantas en cada categoría} \times \text{valor de la categoría (del 1 al 5)}}{\text{promedio Número total de plantas}}$$

(Índice Foliar, Índice Radicular, Altura)

Índice de Bulbificación =
$$\frac{\text{Cantidad de plantas bulbificadas}}{\text{Total de plantas}} \times 5$$

De estas evaluaciones se expondrán los resultados más significativos, tomando como modelo el clon Quivicán.

El desarrollo en la conservación del conjunto de los 16 clones mantenidos a 5-6°C se comparó a partir del porcentaje de bulbificación [(Cantidad de plantas bulbificadas / Total de plantas) x 100] y el grado de bulbificación (1: ≤0.5; 2: 0.5-1cm; 3: ≥1cm de diámetro). A partir de las observaciones realizadas en los primeros clones conservados a baja temperatura (5-6°C), se decidió incorporar al protocolo un precultivo previo a 24°C, durante un mes. El tamaño de muestra mínimo fue de 24 plantas por cada clon.

Aclimatación al sustrato. La aclimatación al suelo de los microbulbillos se evaluó en 3 clones: Quivicán, Güira y Alquizar, procedentes de La Habana. Al final de la conservación, los microbulbillos, sin medio de cultivo, se mantuvieron a 6°C para interrumpir la dormancia (Torres M. A., 2006). Posteriormente, los microbulbillos germinados se transfirieron a vasos plásticos de 200 ml con tres tipos de sustrato, los que fueron previamente esterilizados.

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

Las plantas se mantuvieron en el sustrato hasta que alcanzaron, aproximadamente, los 10 cm de altura, en temperatura e iluminación controlada (≈ 25°C; 12 horas de luz blanca directa). Posteriormente, se transplantaron a canteros en un organopónico, con un sustrato compuesto de capa vegetal y materia orgánica (estiércol vacuno) (1:1), en el período óptimo para el cultivo (del 15 de octubre al 15 de noviembre) y recibieron las atenciones culturales propias del cultivo en organopónico (INIFAT-MINAG, 2000). Del germoplasma obtenido se

tomó una muestra de cada clon (de 5-8 plantas) las que se sembraron, en el próximo ciclo, en la Unidad de Semillas y Extensiones de Banao, en la provincia de Sancti Spíritus.

Producción en campo de plantas conservadas in vitro. Los dientes se sembraron en suelo Ferralítico rojo típico, a una distancia de 40 cm entre surcos, y de 5 cm entre plantas. Se aplicaron 11 riegos que mantuvieron un nivel de humedad adecuado y se realizó un escarde ligero. A los 35 días, se aplicó una fertilización de fondo con fórmula completa, aportando 112 Kg/ha de nitrógeno. Se cosechó cuando el 50% o más de las plantas mostraron la caída del falso tallo. Las cabezas obtenidas presentaron tres dimensiones fácilmente identificables que se denominaron como grandes [peso (P) ≥ 20 g; diámetro (D) ≥ 3.6 cm, medianas ($20 > P \geq 11$ g; $3.6 > D \geq 3.0$ cm) y pequeñas ($P < 20$ g; $D < 3.0$ cm). De cada tamaño se tomó una muestra de 5 cabezas, a la que se evaluó la altura, el diámetro (en cm), el peso (en gramos) y el número de dientes. Para conocer la cantidad de semilla agámica a recuperar de cada planta, se evaluó, el número de dientes, así como la altura, el diámetro y el peso de los dientes, teniendo en cuenta que los dientes utilizables como semilla agámica deben tener 0.5 o más gramos de peso y 0.5 o más centímetros de diámetro (Muñoz de Con, comunicación personal).

Los resultados se analizaron, 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

Conservación a 5-6°C. La Fig. 1 expresa la comparación del índice radicular y de bulbificación desarrollados por el clon Quivacán durante la conservación a las temperaturas de 6 y 24°C. En ella se observa el contraste entre las plantas mantenidas a 6 y 24°C, tanto en el desarrollo de las raíces como en la bulbificación. A 24°C, las plantas se aproximan al índice radicular máximo de 5 (5 o más raíces) al mes; mientras que las conservadas a 6°C no se acercan a este indicador hasta los 2 meses. Estos resultados tienen correspondencia con los obtenidos en otros clones (Torres *et al.*, 2003). Respecto al índice de bulbificación todas las plantas conservadas a 24°C habían bulbificado a los 4 meses de conservación. A 6°C no se observó bulbificación hasta los 6 meses y la bulbificación de todas las plantas se apreció a los 10 meses.

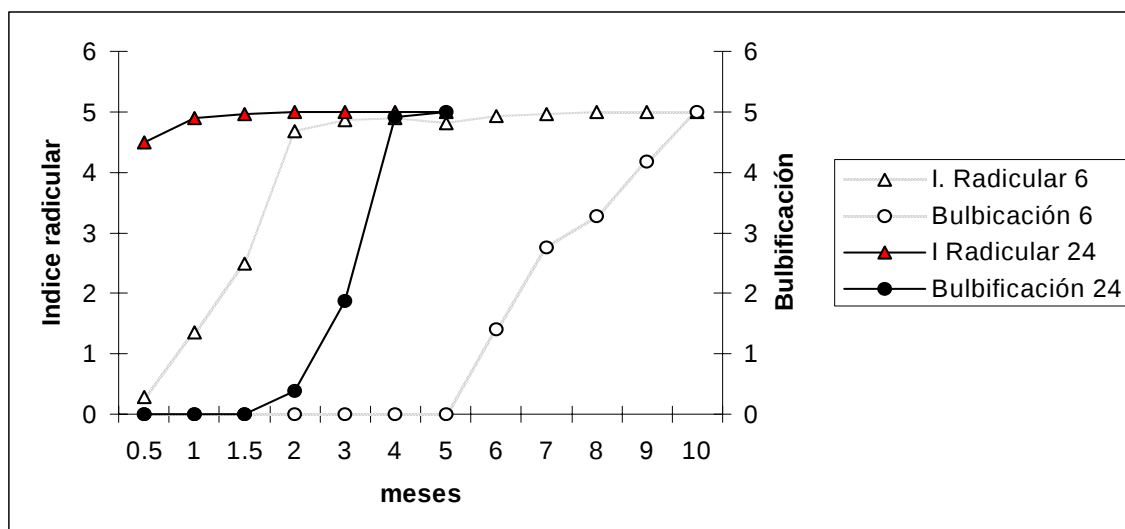


Fig. 1. Comparación del Índice Radicular y de Bulbificación desarrollado por el clon Quivacán a las temperaturas de 6°C y 24°C

△ Índice radicular : △ 6°C ▲ 24°C
○ Índice de bulbificación : ○ 6°C • 24°C

El Cuadro 1 recoge los porcentajes de bulbificación en el tiempo de los 16 clones conservados a 6°C. El porcentaje de bulbificación indicado corresponde al de la primera evaluación en la que dicho porcentaje superó el 50%. La cifra entre paréntesis indica el tiempo de conservación en meses que tenían las plantas cuando lo alcanzaron. Los datos no corresponden a los de un diseño experimental, ya que los clones se incorporaron gradualmente a la conservación. No obstante, se observa que en todos los clones conservados directamente a 6°C (sin precultivo) se requirió de al menos 7 meses para lograr un porcentaje de bulbificación superior al 50%, mientras que los que recibieron el precultivo previo a 24°C superaron el 50% de bulbificación en un período no mayor de 3 meses y presentaron grados de bulbificación relativamente superiores. Dado que el bulbillito acumula las sustancias de reserva que utiliza para generar una nueva planta, se requiere del desarrollo de bulbillos vigorosos, lo que hace recomendable incluir un precultivo a la temperatura del cuarto de cultivo (24°C) previo a la conservación a baja temperatura. Keller y Lesemann (1997), establecen una fase de 2 meses en 15% de sacarosa, a la temperatura de 25°C, previo a la conservación a 3°C del ajo y la cebolla.

Aclimatación al sustrato. La influencia del tipo de sustrato en la fase del desarrollo de las plántulas (generadas a partir de los microbulbillos germinados) se representa en la Figura 2. La Figura expone el comportamiento de 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 de los microbulbillos en el sustrato, no se produjeron variaciones sustanciales en el porcentaje de plántulas desarrolladas. El tipo de sustrato fue el factor que resultó significativo. La materia orgánica (humus de lombriz) fue el sustrato donde se obtuvo el mayor desarrollo de brotes y plántulas (con valores superiores al 60%).

Cuadro 1. Características de la bulbificación de los clones durante la conservación a 6°C.

	Clon	Porcentaje y tiempo en que más del 50% de las plantas bulbificaron (meses)	Grado de desarrollo promedio del bulbillito ¹ /Tiempo de conservación (meses)
Conservación directa a 6°C	Quivicán	55.2 (7) ²	3.0 (20)
	VC Camajuaní	79.2 (8)	2.2 (8)
	VC Vueltas	61.5 (9)	2.8 (11)
	Velasco Holguín	92.8 (8)	2.3 (7)
	Sancti Spíritus	91.7 (7)	2.5 (7)
	Ciego de Ávila	100 (8)	1.5 (8)
	Sierra del Rosario	71.4 (7)	1.5 (7)
	Güira	94.7 (7)	2.1 (7)
Precultivo a 24°C (1 mes)	Quivicán	98.4 (3)	3.0 -
	Villa Clara	72.3 (3)	2.6 (24)
	Batabanó	69.6 (3)	2.0 (11)
	L (2)	100 (1.5)	3.0 (5)
	L (3-5)	55.6 (1)	3.0 (5)
	L (3-9)	86.9 (1)	3.0 (5)
	L (8)	95.2 (1)	3.0 (5)
	L (15)	50.0 (1)	2.8 (5)
	L (17)	85.7 (2)	2.2 (5)

¹Grado de desarrollo del bulbillito: 1: < 0.5 cm; 2: 0.5-1cm; 3: >1cm de diámetro. ²Meses a los que se alcanzó el porcentaje de bulbificación o el grado de desarrollo del bulbillito dado. - No se conserva la muestra.

Producción en campo de plantas conservadas in vitro. La Figura 3 compara las dimensiones de los bulbos antes y después de la conservación *in vitro*, así como a la

terminación de dos ciclos de siembra en el suelo (organopónico y campo) y el secado de los bulbos del clon Quivacán. En ella se observa que el bulbillito, obtenido durante la fase de conservación a baja temperatura, tiene dimensiones notablemente reducidas respecto a las cabezas colectadas. Así mismo, los bulbos obtenidos después de la primera siembra en el organopónico todavía presentan una notable reducción de su tamaño. Sin embargo, las cabezas obtenidas después de la siembra en campo, de modo general recuperaron las dimensiones del germoplasma original (colectado). Los clones Güira y Alquizar tuvieron un comportamiento similar. Esto constituye un aspecto a favor de la utilidad de la conservación *in vitro*, para preservar el germoplasma de ajo, en las condiciones ensayadas. El Cuadro 2 recoge la cantidad de cabezas recuperadas en la segunda siembra por cantidad de bulbillitos germinados y plantados en el organopónico (primera siembra). También muestra la cantidad de semilla agámica recuperada por cada cabeza cosechada en la segunda

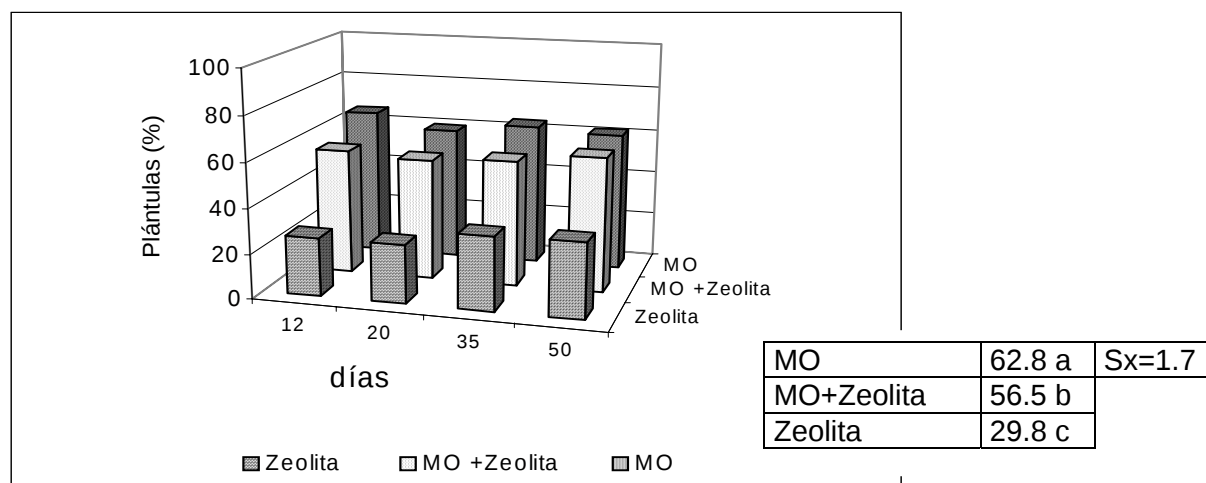


Figura 2. Porcentaje de plántulas desarrolladas en el tiempo para las variantes de sustrato evaluadas. Factor significativo: tipo de sustrato

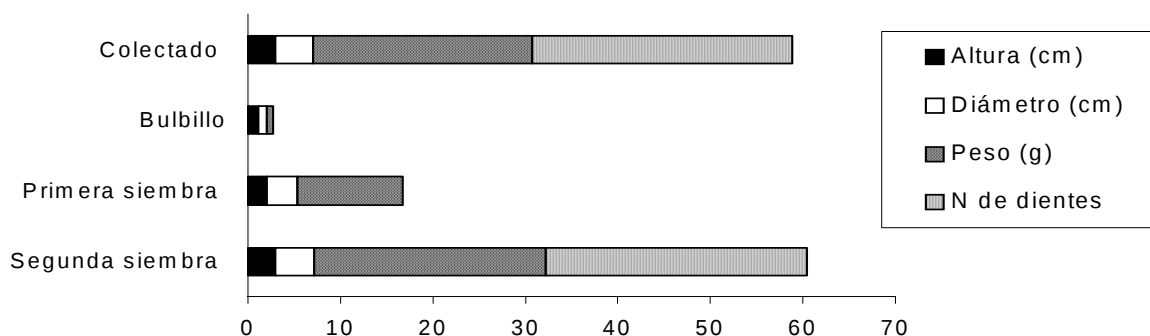


Fig. 3. Variación en las dimensiones de los bulbos de ajo antes del tratamiento de conservación (Colectado), después de la bulbificación *in vitro* (Bulbillo), después de la siembra en organopónico (Primera siembra) y terminada la cosecha en campo (Segunda siembra). Clon Quivacán. No se encontraron diferencias significativas en la comparación del diámetro y del número de dientes de la conservación (Colectado) y después de la cosecha en campo (Segunda siembra). SD (peso) = 0.62, SD (No. de dientes) = 5.9.

siembra y la cantidad de semilla agámica recuperada por bulbillito plantado. El término bulbillito plantado expresa el total de bulbillitos que se sembraron en el organopónico, incluyendo los que regeneraron plantas que produjeron semilla agámica y los que una vez germinados murieron después que fueron plantados en el cantero. Se encontró que por cada bulbillito plantado se obtuvieron de 3 a 5 cabezas en total. El número de cabezas grandes y medianas por bulbillito plantado promedió 1.6 y 2.9 respectivamente, en

dependencia del clon, las que produjeron entre 10 y 17 ajos bulbos (dientes) apropiados para la siembra (peso ≥ 0.5 g, diámetro ≥ 0.5 cm), lo que significa un aproximado de entre 20 y 30 semillas por cada bulbillo plantado. Para el cálculo no se tuvieron en cuenta las cabezas pequeñas, porque la proporción de ajos semilla fue, por lo general, inferior al 50%, en correspondencia con lo planteado por Muñoz (1973). No obstante, ese germoplasma constituye un potencial para siembras sucesivas.

Cuadro 2. Cantidad de cabezas¹ obtenidas en la segunda siembra por bulbillo plantado en la primera. Cantidad de semilla agámica² por cada cabeza obtenida en la segunda siembra y por cada bulbillo plantado en la primera.

Clon	Cantidad de cabezas x bulbillo	Cantidad de semilla agámica x cabezas	Cantidad de semilla agámica x bulbillo
Quivicán	3.6	17.2	31.0
Güira	5.2	10.2	29.0
Quivicán	3.5	15.0	24.0

¹ El cálculo se realizó sobre la base de las cabezas grandes y medianas.

Semilla agámica². Dientes de ajo con más de 0.5 g de peso y 0.5 cm de diámetro.

CONCLUSIONES

A partir de la colecta de los campesinos, la colección de campo mantenida en Banao (provincia de Sancti Spíritus), y el programa de mejoramiento del INIFAT, se conformó una colección de 18 clones de ajo, la que se mantiene conservada a la temperatura de 5-6°C.

La disminución de la temperatura de conservación hasta 5-6°C retardó notablemente el crecimiento del clon Quivicán, dado por el número de raíces y la bulbificación. Así mismo, los 8 clones que se introdujeron en la baja temperatura (6°C) (sin precultivo previo) requirieron de mayor tiempo para que las plantas bulbificaran que los que recibieron un precultivo a 24°C. También se observó la tendencia a que estas plantas presentaran mayor talla de los microbulbillos respecto a las conservadas directamente a 6°C.

Utilizando como sustrato la materia orgánica (humus de lombriz), el desarrollo de las plántulas fue superior al 60%. A partir de ellas, se generaron plantas que completaron su ciclo biológico en el organopónico.

Después de dos ciclos de cultivo en suelo las plantas derivadas de la conservación *in vitro* recuperaron sus características fenotípicas. La cantidad de semilla agámica recuperada por bulbillo (que sobrevivió la aclimatación) contribuyó a recuperar las pérdidas que se produjeron durante estos procesos, con un coeficiente de multiplicación de 20 y 30 bulbos (dientes) apropiados para la siembra (peso ≥ 0.5 g, diámetro ≥ 0.5 cm).

Los resultados recogidos en este trabajo aún cuando pueden ser optimizados, aportan elementos a favor de la posibilidad de utilizar los métodos biotecnológicos para la conservación a corto plazo de semilla agámica de ajo en bancos de germoplasma y como una forma alternativa de disponibilidad de semillas para incorporar a la producción.

REFERENCIAS

- Dustan, D. I. y K. C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70-72.
- INIFAT-MINAG, 2000. Manual Técnico de Organopónicos y Huertos Intensivos. Grupo Nacional de Agricultura Urbana. 145 p.
- Keller, J. y R. Fritsch. 1997. Establishment of *in vitro* clones in the Gatersleben garlic collection. *Actas Etnobotánica* 92: 155-161
- 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.
- Lerch, 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-Técnica, La Habana. 451p.

- Mansilla, F. 2002. Situación actual, características y técnicas del cultivo del ajo. Vida Rural. <http://www.criba.edu.ar/cersos/10.htm>.
- Moreno, V.; A. Pérez; Y. Muñoz; M. López y E. Reyes. 2003. Incremento de la variabilidad conservada *ex situ* por prospecciones nacionales. En: Caracterización y ampliación de la variabilidad genética del germoplasma de ajo en Cuba. Informe Final del Proyecto CITMA 003181 del Programa de Biotecnología Agrícola. 30p.
- Murashige, T.; F. Skoog,. 1962. A revised meduim for rapid growth and bioessays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Torres, M. A; J. Alonso; A. Font y V. Moreno. 2003 Conservación de yemas de ajo a baja temperatura. En: Caracterización, Conservación y ampliación de la variabilidad genética del germoplasma de ajo en Cuba. Informe Final del Proyecto CITMA 003181 del Programa de Biotecnología Agrícola 30p.
- 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.