

INFLUENCIA DE UN TRATAMIENTO A BAJA TEMPERATURA Y EL ESTADO FISIOLÓGICO DE LOS BULBOS DE AJO SOBRE LA BULBIFICACIÓN *IN VITRO*

Ana Julia Rodríguez Mansito, María de los Ángeles Torres Mederos, Laura Muñoz de Con, Norma Marrero Granado y Odalys Pérez Díaz

RESUMEN

El germoplasma de ajo se mantiene mediante colecciones de campo y el almacenamiento de los bulbos entre los ciclos de crecimiento vegetativo, por lo que está expuesto a diferentes riesgos naturales y humanos. La conservación *in vitro*, constituye una forma complementaria de disminuir los riesgos de pérdidas. El objetivo del trabajo fue determinar las condiciones de manejo para el establecimiento *in vitro* que permitan disminuir el tiempo requerido para lograr la maduración de los bulbillos y que estos acumulen las reservas requeridas para la próxima brotación. Se estudió la influencia de un tratamiento a baja temperatura y el estado fisiológico de los bulbos de ajo sobre la bulbificación *in vitro*. Se utilizaron los clones 'Tropical 1', 'Tropical 3' y 'Tropical 14-2', que se introdujeron *in vitro* en julio y septiembre. Un mes antes de cada introducción, los bulbos se colocaron a 6°C y una réplica de cada uno se mantuvo a temperatura ambiente. Después se realizaron evaluaciones del Índice Visual de Dormancia (IVD). Los bulbos se introdujeron en un medio MS, y a los siete días se evaluó la brotación. Seguidamente, se extrajeron como explantes los ápices de crecimiento del diente, se colocaron en medio BDS suplementado con 10 % de sacarosa, y se mantuvieron en el cuarto de cultivo durante dos meses, a la temperatura de 24 ± 2°C. Se cuantificó la cantidad de explantes que desarrollaron en plantas y llegaron a bulbificar y se evaluó, el diámetro y el peso de los bulbillos formados. El tratamiento con temperatura de refrigeración incrementó el IVD de los bulbos, la brotación, la cantidad de plántulas y bulbillos formados.

Palabras claves: ajo, bulbificación, tratamiento a baja temperatura

Influence of a treatment of low temperature and the physiological stage of garlic bulbs on *in vitro* bulbification

ABSTRACT

Garlic germplasm is kept through field collections and bulbs maintaining between vegetative growth cycles. Because of that they are exposed to natural and human risks. *In vitro* conservation is a complement to minimize lost. The objective of the present study was to determine work conditions for *in vitro* establishment to minimize ripening time of bulblets. It was studied the influence of a treatment of low temperature and the physiological stage of garlic bulbs (cloves) on garlic *in vitro* bulbification. 'Tropical 1', 'Tropical 3' and 'Tropical 14-2' clones, were tested, and

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

they were introduced to *in vitro* conditions in July and September. One month before each introduction, garlic bulbs were placed at 6°C and a replica of each one of them stayed to environment temperature. After that, Visual Dormancy Index (VDI) was calculated. Garlic bulbs (cloves) were placed in MS medium, and germination was evaluated at seven days. Subsequently explants containing basal growing apices were extracted and placed on BDS medium supplemented with 10 % sucrose and they were maintained at 24 ± 2°C in a culture room for two months. The explants that developed in plants and bulblets were quantified and diameter and weight bulblets were evaluated. Low temperature treatment increase cloves IVD, shooting and the quantity of plantlets and bulblets obtained.

Key words: garlic, bulbification, low temperature treatment

INTRODUCCIÓN

El ajo es una especie de alto valor culinario, a la que se le atribuyen diferentes propiedades medicinales (Rahman, 2007; National Center Institute, 2008; Iannazzo, 2009); por ello la conservación de su germoplasma ha sido objeto de estudio en los últimos años (ECP/GR Working Group on Allium, 2006; Hassan *et al.*, 2007; Shemesh *et al.*, 2008; Stavílková, 2008). Esta especie no produce semilla botánica en las condiciones de cultivo; su germoplasma se mantiene mediante colecciones de campo y el almacenamiento de los bulbos entre los ciclos de crecimiento vegetativo, por lo que está expuesto a diferentes riegos naturales y humanos. La conservación *in vitro*, en temperaturas que reducen la tasa de crecimiento de las plantas, constituye una forma complementaria para disminuir los riesgos de pérdidas.

El ajo es una especie notablemente influenciada por las condiciones de cultivo. Según Portela y Cavagnaro (2005) para el desarrollo normal de la planta es necesario que la misma reciba una cierta cantidad de horas de frío, lo que puede ocurrir durante el proceso vegetativo, o incluso antes si se almacena la «semilla» a baja temperatura (entre 7°C y 10°C). En estudios sobre el desarrollo fisiológico de la planta de ajo, los autores señalan que la temperatura (junto al fotoperíodo) controla las diferentes fases de desarrollo de la misma en campo, de modo que las temperaturas mínimas muy bajas y constantes acortan la etapa del crecimiento vegetativo inicial (expansión de las hojas a partir de las reservas desde el bulbillo), pero en la fase de rápido crecimiento del bulbo son las altas temperaturas las que aceleran el proceso.

Por otra parte, se señala que la conservación de los bulbos de plantación a bajas temperaturas pueden disminuir el rendimiento y su calidad comercial (López-Bellido, 2003), mientras que en el caso de la variedad de ajo rosado «Akukeli» las temperaturas inferiores a los 10°C, previo a la plantación o durante el período de crecimiento antes de la bulbificación, constituyen un requerimiento para que las plantas lleguen a bulbificar (González, 2006).

En la experiencia de trabajo del Laboratorio de Biotecnología del INIFAT, se ha observado que, en ocasiones, los clones introducidos *in vitro* en fechas similares a la fecha óptima para la siembra en campo, demoran en bulbificar, lo cual pudiera deberse a que, en los meses más fríos del año, las temperaturas semicontroladas del cuarto de cultivo pueden no ser suficientemente altas para estimular la bulbificación, lo que repercute negativamente en el manejo del germoplasma, acortando el ciclo de conservación a baja temperatura, debido a un adelanto en la brotación de los bulbillos en conservación.

Por todo lo anterior, es de interés determinar condiciones de manejo para el establecimiento *in vitro* que permitan disminuir el tiempo requerido para lograr la maduración de los bulbillos, y lograr que estos acumulen las reservas requeridas para la próxima brotación, lo cual está relacionado con sus dimensiones.

En este trabajo se estudió la influencia de un período de mantenimiento a baja temperatura (6°C) sobre la bulbificación *in vitro* de ajo para dos estados fisiológicos del bulbo, expresado por el Índice Visual de Dormancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con los clones de ajo ‘Tropical 1’, ‘Tropical 3’ y ‘Tropical 14-2’, obtenidos por mejoramiento genético en el INIFAT, sembrados en campo y cosechados al mismo tiempo, por lo que tuvieron las mismas condiciones de cultivo y de almacenamiento, al momento de su introducción *in vitro*.

Se ensayaron dos tratamientos: en uno de ellos, un mes antes de la introducción *in vitro*, los bulbos se colocaron en un refrigerador doméstico a la temperatura de 6°C, (tratamiento identificado como R), mientras que el otro consistió en mantener los bulbos a la temperatura ambiente (A). Transcurrido ese tiempo, se realizaron evaluaciones del estado fisiológico de los bulbos respecto a la terminación del período de dormancia, dado por el Índice Visual de Dormancia (IVD), el cual se expresa mediante la relación entre la longitud de la hoja de brotación (B), y de la hoja de reserva (R), aplicándose la fórmula $IVD = (B/R \times 100)$ (Burba, 2004) (Figura 1). A continuación se procedió a su introducción *in vitro*.

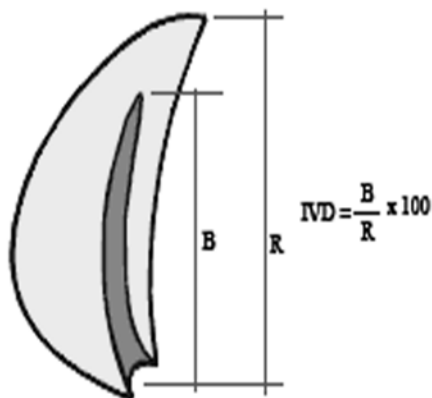


Figura 1. Índice Visual de Dormancia (IVD) (Fuente: Burba, 2004)

Los bulbos desinfectados, según Torres (2007), se sembraron en medio Murashige y Skoog (1962) (MS) para estimular la emergencia de la hoja de brotación.

Posteriormente, se extrajeron los explantes (de un cm de altura y de 0,5 a 0,8 cm de diámetro), se sembraron en medio BDS enriquecido con 10 % de sacarosa, y se mantuvieron en el cuarto de cultivo por un período de dos meses, a la temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Después de este período, se cuantificó la cantidad de explantes que desarrollaron en plantas y llegaron a bulbificar y se evaluó, el diámetro y el peso de los bulbillos formados.

El tamaño de muestra por cada tratamiento fue de 24 plantas, y el IVD se evaluó en muestras adicionales de 10 réplicas, teniendo en cuenta que es un análisis destructivo.

Los valores del porcentaje de bulbificación se compararon estadísticamente mediante un análisis trifactorial para muestras univalentes. Los datos se transformaron mediante la expresión $X=2 \arcsin \sqrt{p}$ (Lerch, 1977).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al analizar el estado fisiológico de los bulbos, dado por el Índice Visual de Dormancia (IVD), al terminar los tratamientos de temperatura (refrigeración y ambiente), antes de su introducción *in vitro* (Tabla 1), se puede apreciar que, como era de esperarse, al aumentar el tiempo de almacenamiento postcosecha hacia la época de siembra (de julio a septiembre) aumentó el IVD, tanto para los bulbos mantenidos en temperatura ambiente como para los refrigerados. No obstante, los bulbos mantenidos al ambiente aún se encontraban en la fase de dormancia, ya que el IVD se mantenía por debajo del 75 %, establecido por Burba (1991) como indicador de que los mismos han finalizado esa fase.

Por otra parte, los bulbos mantenidos durante un mes en refrigeración (6°C), mostraron valores del IVD superiores al 75 % (Tabla 1; Figura 2). El efecto de la refrigeración sobre los bulbos se manifestó en el aumento del IVD en más de un 20 %, respecto al ambiente. En ambos períodos (julio y septiembre) los bulbos sobrepasaron el índice del 75 %, considerado adecuado para la siembra en condiciones de campo.

Tabla 1. Brotación expresada por el Índice Visual de Dormancia de los bulbos (dientes) mantenidos a temperatura ambiente y refrigeración (%), evaluados en julio y septiembre

Introducción <i>in vitro</i>	Tratamientos			
	Ambiente		Refrigeración	
	julio	septiembre	julio	septiembre
IVD	48.8	61.6	77.4	87.4



Figura 2. Brotación de los bulbos de ajo. En la parte superior el bulbo alcanza un IVD del 100 %; en la inferior, el bulbo se aproxima al 75 %

En cuanto a la ocurrencia de la brotación de los ápices de crecimiento al ser sembrados los bulbos en el medio MS (Figura 3) se observó, en los tres clones, que la emisión de brotes fue notablemente mayor en los bulbos refrigerados que en los mantenidos a temperatura ambiente, alcanzándose valores entre 86,9 % y 100%; en contraste con los bajos niveles de brotación obtenidos en los bulbos que no recibieron el tratamiento (temperatura ambiente), en los que el valor más alto solo llegó al 54,1 %.

Una parte de los bulbos no llegaron a brotar a pesar de que se mantuvieron por dos meses en el medio MS (Figura 4). Al realizar un corte longitudinal de bulbos no brotados se pudo apreciar un endurecimiento y el desarrollo de una coloración verde en la hoja de reserva. Al parecer el brote no desarrolló el vigor suficiente para emerger, lo que posiblemente estuvo asociado a que el IVD antes del establecimiento *in vitro* fue entre el 25 y el 30 %, inferior al valor del 40 %, considerado como un requerimiento por Seguel (2002) para que el establecimiento *in vitro* del ajo resulte satisfactorio.

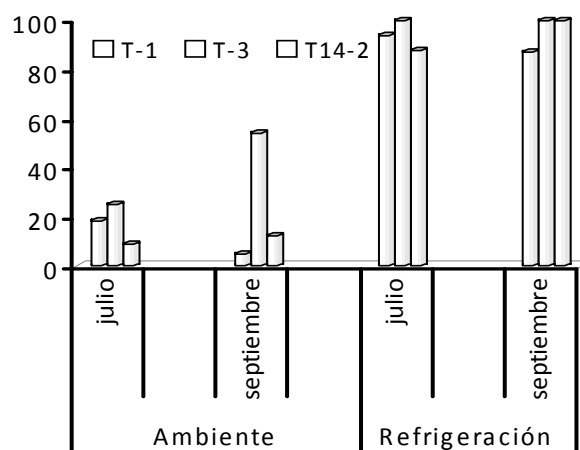


Figura 3. Brotación de los ápices de crecimiento de los bulbos (dientes) de los clones T-1, T-3 y T14-2, que habían sido mantenidos a temperatura ambiente y refrigeración, a los siete días de ser sembrados en el medio MS, en los meses de julio y septiembre (%)

Una vez que las plantas se mantuvieron por dos meses en el medio BDS con 10 % de sacarosa, el porcentaje de explantes que desarrollaron plantas y bulbificaron (Tabla 2) tuvo el comportamiento esperado, teniendo en cuenta los resultados del Índice Visual de Dormancia y la brotación. En general, se apreció un incremento en el porcentaje de bulbificación del 40 % o más para el tratamiento refrigerado respecto al mantenido a la temperatura ambiente. En el tratamiento refrigerado también se observó la influencia del IVD (Tabla 1).

La comparación estadística demostró el efecto del tratamiento con baja temperatura sobre el porcentaje de plantas que llegaron a bulbificar (Tabla 3), aun cuando los valores considerados para el mes de septiembre corresponden a los dos meses de la inducción de la bulbificación (Tabla 2).



Figura 4. Bulbos que no recibieron el tratamiento a baja temperatura antes de su introducción *in vitro*

Tabla 2. Porcentaje de bulbificación de tres clones de ajo, mantenidos a temperatura ambiente y refrigeración e introducidos *in vitro* en julio y septiembre (%)

Clones	Tratamientos			
	Ambiente		Refrigeración	
	julio (3 meses) ¹	septiembre (3 meses)	julio (3 meses)	septiembre (2 meses)
T-1	33.3	62,5	75.0	85.7
T-3	9.0	60,0	75.0	91.7
T-14-2	20.0	50,0	75.5	100.0

¹ Tiempo de inducción de la bulbificación

Tabla 3. Porcentaje de bulbificación. Medias de los tratamientos del factor temperatura

	Tratamientos		Fcalculada	F tabla 5%
	Ambiente	Refrigeración		
Medias (%)	35	86	28,9 *	18.5

Este dato reviste notable importancia para los objetivos del trabajo, ya que con este tratamiento se persigue reducir el tiempo que las vitroplantas necesitan para bulbificar, y con ello disminuir su estadía en el cuarto de cultivo.

Portela y Cavagnaro (2005) en su estudio sobre el comportamiento fisiológico de los ajos blancos y rosados, señalan que cuando las temperaturas nocturnas (mínimas) son muy bajas y constantes, pueden acortar el tiempo necesario para el desarrollo de la etapa de crecimiento vegetativo inicial, lo que incide indirectamente en el

tiempo requerido para la bulbificación. Por otra parte, Burba (2003) asevera que «para alcanzar la etapa de formación del bulbo, el ajo requiere la exposición a bajas temperaturas durante un período mínimo variable en función del genotipo, seguida por días que se alargan, en una típica respuesta del tipo de día largo. Si bien el fotoperíodo es un factor muy importante en el inicio del proceso de bulbificación, la temperatura es el determinante de toda la ontogenia de la planta. Si el estímulo térmico acumulado por ésta es superior al mínimo necesario, la bulbificación ocurre con

fotoperíodos cada vez más cortos, hasta hacerse incluso independiente de este factor. Si el estímulo acumulado no es suficiente, la bulbificación puede no producirse, aún bajo fotoperíodo adecuado».

El hecho de que en la comparación estadística se incluyera una muestra con un tiempo de tratamiento menor posiblemente influyó en que el efecto del período de siembra (julio/septiembre) no resultara significativo como se muestra en la Tabla 4, aunque puede observarse una notable diferencia entre las medias.

No obstante, al hacer el análisis en esta manera lo que se persigue es destacar el efecto del tratamiento con baja temperatura en reducir en un mes el tiempo requerido para que se concluya el proceso de bulbificación, al menos para las plantas cosechadas en esa época de siembra. Téngase en cuenta que este proceso es lento en el tiempo y que no es posible establecer evaluaciones periódicas de los indicadores (diámetro y peso del bulbillo), por el riesgo que representan las contaminaciones y las pérdidas de réplicas. En el caso de que la temperatura del cuarto de cultivo sea semicontrolada, con cierta dependencia del ambiente, como ocurre en los locales climatizados, el efecto de un período de refrigeración de los bulbos semilla a establecer *in vitro*, permite lograr la bulbificación en un periodo del año, de temperaturas más altas, aspecto que facilita este estadio, pues una vez que el proceso se ha iniciado es favorecido por las altas temperaturas (Portela y Cavagnaro, 2005).

En la Figura 5 se observa la diferencia en el desarrollo de los microbulbillos formados a partir de los bulbos (dientes), mantenidos a la temperatura ambiente y la refrigeración, introducidos *in vitro* en el mes de septiembre. Como puede apreciarse, los explantes obtenidos de bulbos sometidos a la refrigeración produjeron microbulbillos que completaron su desarrollo, lo que se evidencia en la marchites de las hojas, y en que solo quedan restos de la hoja de reserva.

En contraste, los que no recibieron el tratamiento mantienen las hojas verdes y no se aprecia manifestación de desarrollo del bulbillo. Además, la hoja de reserva del diente presenta poco cambio respecto al inicio de la inducción de la bulbificación.

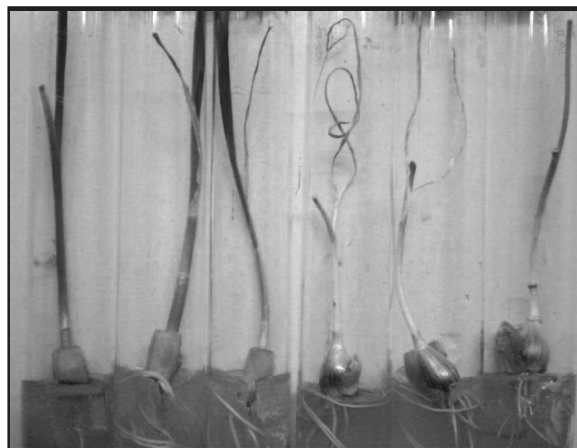


Figura 5. Comparación del desarrollo de la bulbificación

El efecto de las bajas temperaturas en la estimulación de la brotación también ha sido señalado por Mujica *et al.* (2006), quienes mantuvieron los «dientes» bajo refrigeración (8 a 10°C) durante 15 días para estimular la brotación.

En cuanto a las dimensiones (diámetro y peso) de los microbulbillos una vez concluida la bulbificación, se observó que en los obtenidos a partir de dientes refrigerados se produjo una tendencia a un mayor tamaño en los sembrados en septiembre respecto a los establecidos en julio (Figura 6), lo cual es congruente con su estado fisiológico, expresado por su IVD (Tabla 1), lo que significa que los dientes tienen un estado más avanzado hacia la terminación de la dormancia y la brotación. Al parecer, en las condiciones *in vitro* se mantiene una relación similar a la tasa de conversión señalada por Burba (2003) en condiciones de campo.

Tabla 4. Porcentaje de bulbificación. Medias de los tratamientos del factor fecha de siembra

	Tratamientos		F calculada	F tabla 5%
	julio	septiembre		
Medias (%)	43.0	80.0	13.6	18.5

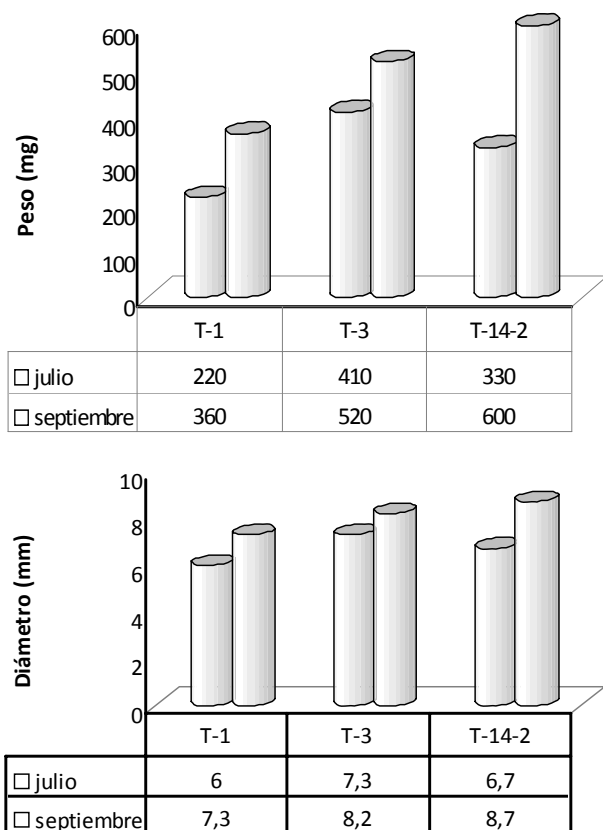


Figura 6. Dimensiones (diámetro y peso) de los bulbillos originados a partir de los bulbos (dientes) refrigerados, antes de la introducción *in vitro*

El autor plantea que «la tasa de conversión en el ajo está dada por la relación peso a peso entre el «diente» plantado y el bulbo cosechado. Los bulbos de cada semilla tienen una fórmula dentaria propia y se comportan de manera distinta como donantes de «semillas». Es por ello que el conocimiento del tamaño mínimo de «semilla» o la mejor relación de conversión es uno de los factores de manejo que más incide en los rendimientos comerciales. De aquí la importancia de obtener bulbillos vigorosos para su posterior conservación *in vitro*. Por todos estos elementos, el tratamiento de refrigeración de los bulbos antes del establecimiento *in vitro* resulta una opción a tener en cuenta para la incorporación de las entradas a la colección conservada por reducción de la tasa de crecimiento.

Los explantes de la izquierda se mantuvieron a temperatura ambiente y los de la derecha en refrigeración, durante un mes, antes de la introducción *in vitro*.

Los resultados de este trabajo guardan completa coherencia con el comportamiento del cultivo en condiciones de campo descrito por Burba, señalados anteriormente, en relación al efecto de la temperatura en la ontogenia de la planta de ajo.

CONCLUSIONES

- ❖ El tratamiento con temperatura de refrigeración (6°C) de los bulbos de ajo, durante un mes, antes de su introducción *in vitro* favoreció la brotación de la nueva planta, evidenciado por el Índice Visual de Dormancia (IVD), la emisión de plántulas una vez que los bulbos se establecieron *in vitro* y el porcentaje de plantas bulbificadas.
- ❖ Los bulbos refrigerados establecidos *in vitro* en el mes de septiembre manifestaron mayores dimensiones que los establecidos en el mes de julio, en correspondencia a su mayor valor del IVD.
- ❖ El tratamiento de refrigeración ofrece una opción para adelantar la fecha de establecimiento *in vitro* de los clones en estudio, respecto al período óptimo de siembra en campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burba, J. L. Producción, propagación y utilización del ajo (*Allium sativum* L.). En Moreno, V.; F. M. Cañet; L. Pérez, E. Reyes; R. Ronda; N. Fraga y M. C. Alonso. 1994. Agrophysiological classification of Cuban garlic (*Allium sativum* L.) landraces. Plant Genetic resources Newsletters No 99: 36-37, 1991.
- Burba, J. L. Manipuleo, almacenamiento y transporte del ajo. Congreso Argentino de Horticultura, Merlo, San Luí, 27 pp., 2004.
- Burba, J. L. Ajos argentinos. Diferenciarse para ser más competitivos. INTA. La Consulta, Mendoza. *Revista IDIA XXI*, No. 4, Sección Ajos: 45-49, 2003.

- ECP/GR. Working Group on Allium. Progress report for the period 2003-2006. [HTTP://www.ecpgr.cgiar.org/SteeringCommittee/SC10/StandRep/Allium-standrep.pdf](http://www.ecpgr.cgiar.org/SteeringCommittee/SC10/StandRep/Allium-standrep.pdf): Consultado: 21 de septiembre de 2009, 2006.
- González, M. I. Akukeli» una nueva variedad de ajo rosado. *Agricultura Técnica (Chile)* 66 (2): 210-215, 2006.
- Hafizur Rahman, M.; M. Shahidul Hhaque, M. A. Karim and M. Ahmed. Effects of Gibberellic Acid (GA3) on Breaking Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L.) *International Journal of Agriculture & Biology*. 1560-8530/2006/08-1-63-65. <http://www.fspublishers.org>, 2006.
- Hassan, N. A.; A. A. El-Halguagi; A. Gaber; M. Al-Awady y A. Khalaf. Slow growth in vitro conservation of garlic cultivars grown in Egypt: chemical characterization and molecular evaluation. 2007. *Global Journal of Molecular Sciences*, 2 (2): 67-75, 2007.
- Iannazzo, Ch. A healing herb-garlic (*Allium sativum*) a scientific-proven medicinal treasure trove. *Herbal Medicine*. Suite 101.net., 2009.
- López-Bellido, F. J.; Cabrera, J.; Alía, J. M.; Recio, D.; López-Bellido, R. J.; Verdejo, C.; Serrano, M. *Actas de Horticultura No 39, X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas, Pontevedra, 395-397, 2003.*
- Moreno, V.; F. M. Cañet; L. Pérez; E. Reyes; R. Ronda; N. Fraga y M. C. Alonso. *Plant Genetic Resources Newsletters*, No. 99: 36-37, 1994.
- Mujica, H.; M. E. Sanabria, N. Mogollón y Y. Perozo. Formación *in vitro* del bulbo del ajo morado (*Allium sativum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 25: 197-210, 2008.
- National Center Institute. Garlic and cancer prevention: questions and answers (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/general>), 2008.
- Portela, J. A.; Cavagnaro, J. B. Escala fisiológica para ajos blancos y violetas: Una herramienta fundamental para la toma de decisiones en el cultivo. *Estación Experimental Agropecuaria La Consulta. Informe Anual de Progresos*. 42-45. 2005.
- Rahman, K. Effects of Garlic on Platelet Biochemistry and Physiology *Molecular Nutrition & Food Research*. 51(11): 1335-44, 2007.
- Seguel, B. I. Saneamiento y conservación de germoplasma de ajo mediante técnicas de cultivo in vitro En: *Cultivo del ajo (Allium sativum L.) para la zona sur de Chile*. Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias no. 84. Temuco. p. 122-129, 2002.
- Shemesh, E.; O. Schoiten; H. D. Rabinowitch y R. Kamenetsky. Unlocking variability: inherent variation and developmental traits of garlic plants originated from sexual reproduction. *Planta*, 227(5): 1013-1024, 2008.
- Stavilíková, H. Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection-information. *Hort. Sci. (Prague)*, 35 (3): 130-135, 2008.
- Torres, M. A. Conservación alternativa de semilla de ajo por métodos biotecnológicos. *Informe Final del Proyecto 1806 del Programa Ramal Producción Nacional de Semillas, MINAG*, 52p., 2007.

Recibido: 5 de marzo de 2011
 Aceptado: 6 de septiembre de 2011