

EFFECTO DEL PRECULTIVO EN SACAROSA SOBRE LA BULBIFICACIÓN Y LA CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)

Adriana Torres Martínez, María de los A. Torres, Ana Julia Rodríguez y Odalys Llorente.

Instituto de investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
"Alejandro de Humboldt" (INIFAT), Cuba
adriana@inifat.co.cu

RESUMEN

El ajo es muy apreciado como especie y planta medicinal, por ello su germoplasma es conservado en diferentes regiones y países. La conservación de ajo por reducción de la tasa de crecimiento se ha estudiado en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), durante los últimos 10 años. Para la conservación de este germoplasma es importante obtener bulbos vigorosos que generen plantas viables en el próximo ciclo de crecimiento. Con este objetivo se determinó el efecto del precultivo en sacarosa sobre la bulbificación y la conservación *in vitro* de tres tipos de ajo. Con el cultivo directo del explante en sacarosa al 10% se obtuvieron los bulbillos de mayor diámetro y peso. El precultivo con incremento escalonado en la concentración de sacarosa de 3-10% y 3-15% no incrementó el desarrollo de los bulbillos.

Palabras claves: Conservación *in vitro*, ajo, bulbificación, sacarosa.

SUCROSE PRECULTURE EFFECT ON BULBIFICATION AND *IN VITRO* CONSERVATION OF GARLIC (*Allium sativum* L.)

ABSTRACT

Garlic is very appreciated as specie and medicinal plant. That is why it's germplasm is conserved in different regions and countries world wide. Slow growth of garlic germplasm has been studied at the Institute of Fundamental Research on Tropical Agriculture (INIFAT) during the last decade. For garlic slow growth conservation is important to obtain vigorous bulblets which generate viable plantlets in the next vegetative growth cycle. The objective of this paper is to study the effect of sucrose preculture on *in vitro* bulbification and conservation of three garlic types. Preculture at 10% sucrose concentration produced bulblets of higher diameter and weight. Two steps preculture at 3-10% and 3-15% sucrose concentration did not increase bulblets development.

Key words: *in vitro* conservation, garlic, bulbification, sucrose.

INTRODUCCION

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las plantas cultivadas que, desde la antigüedad, es reconocida como un condimento valioso en la cocina y como agente terapéutico para varios desórdenes alimenticios o enfermedades. Se considera eficaz como antibiótico (Fareed, 2007), en el control de enfermedades del sistema cardiovascular (Chan *et al.*, 2007; Kojuri *et al.*, 2007; Rahrman, 2007;), y se relaciona con la prevención de diferentes tipos de cáncer (Setiawan *et al.*, 2005, Devrim y Durak, 2007), entre otras acciones terapéuticas.

Es una planta agámica, por lo que se propaga mediante bulbos o "dientes" que se forman en cada ciclo (Mujica y Mogollón, 2008), con las consiguientes desventajas que este método ofrece.

La conservación *in vitro* mediante la reducción de la tasa de crecimiento a bajas temperaturas es una forma viable para conservar su germoplasma (ECP/GR Working Group on *Allium*, 2006; Hassan *et al.*, 2007; Shemesh *et al.*, 2008; Stavělíková, 2008). En los últimos años, en el Banco de Germoplasma del INIFAT se ha trabajado en este propósito (Torres *et al.*, 2003, 2006). En la experiencia del trabajo se ha constatado que los bulbillos más grandes, con mayores reservas acumuladas, generalmente producen brotes de mayor vigor una vez terminada la fase de conservación; por ello, es importante que los bulbillos a conservar sean vigorosos.

El precultivo en sacarosa juega un papel importante en la bulbificación *in vitro* de ajo (Mujica y Mogollón, 2004). Por este motivo, es necesario evaluar diferentes variantes con vistas a obtener bulbillos de mayor tamaño y vigor. Un aspecto a valorar es el del nivel de sacarosa más adecuado. También resulta de interés definir si un subcultivo previo de las plantas en medio con sacarosa al 3% (en el que se produce buen desarrollo foliar) podría contribuir al desarrollo final del bulbillito. Con los objetivos propuestos se acometió el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Como material biológico se utilizaron clones de ajo del tipo Criollo, Vietnamita y Chileno, colectados en la provincia de La Habana, una de las principales regiones productoras del país: el primero en la localidad de Batabanó y los otros dos en la de Quivicán.

Los dientes de ajo se lavaron con agua y detergente comercial, y se enjuagaron en agua corriente. Para su desinfección se colocaron en alcohol al 70% por un minuto y a continuación con hipoclorito de sodio al 5%, durante 15 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril por tres veces. A los dientes se les eliminó la parte externa de la base (0,5-1 mm) y se les realizó un ligero flameo (Torres, 2006) y se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin la adición de reguladores del crecimiento.

A los 7 días de cultivo, se eliminaron los bulbos que quedaron contaminados y se procedió a la extracción de los explantes (10 mm de longitud y 5 a 8 mm de diámetro, manteniendo el ápice de crecimiento). Los explantes se sembraron en medio BDS (Dunstan y Short, 1977) con 3, 10 y 15% de sacarosa durante un mes.

En el próximo subcultivo, las plantas cultivadas inicialmente en sacarosa al 3% se transfirieron al mismo medio, pero elevando la concentración de sacarosa al 10 y 15%. Las que se sembraron desde el inicio en esas concentraciones se transfirieron al mismo medio fresco manteniendo la concentración inicial.

Los tratamientos se resumen en la Tabla 1.

Tabla1. Variantes de la concentración de sacarosa en la fase de bulbificación.

Tratamientos	Concentración de sacarosa (%)	Concentración de sacarosa	
		1 ^{er} Subcultivo (1 mes)	2 ^{do} Subcultivo (2 meses)
1	3/10	3%	10%
2	3/15	3%	15%
3	10	10%	10%
4	15	15%	15%

Los cultivos se mantuvieron a la temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y fotoperíodo de 16 horas luz. A los dos meses se transfirieron a medio de cultivo fresco para ser conservados en cámara fría a $5-6^{\circ}\text{C}$ y condiciones de oscuridad.

Cada 15 días, se evaluó la altura (cm) y la cantidad de hojas de las vitroplantas. De los microbulbillos, se cuantificó la ausencia o presencia, el grado de desarrollo (DM), según la escala: 1 < 0.5; 2: 0.5-1cm; 3: >1cm de diámetro, y el peso final (mg). El tamaño de muestra fue de 24 plantas por cada clon.

Los resultados se evaluaron mediante un Análisis de Varianza de clasificación simple y posteriormente se detectaron las diferencias entre las medias mediante la prueba de comparación de mínima diferencia significativa (DMS). En todos los casos se empleó el programa STATGRAPHICS, versión 5.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Figura 1 se puede observar que en el caso de los clones Criollo y Chileno la bulbificación se hizo notable en las primeras dos semanas de cultivo para los tratamientos que se sembraron directamente en el medio suplementado con 10 y 15% de sacarosa, mientras que en el genotipo Vietnamita la bulbificación fue más lenta que en los dos anteriores.

En el caso de los clones Criollo y Chileno, cuando los explantes se sembraron directamente en medio con sacarosa al 10 y 15%, se produjo mayor desarrollo del bulbillito (DM) que cuando se cultivaron previamente en el medio con la concentración del 3%. En el clon Vietnamita se encontró un comportamiento similar, con menores diferencias entre las variantes. Estos resultados permiten resumir que el subcultivo en sacarosa 3% (antes del cultivo en las concentraciones del 10 ó el 15%) no tuvo un efecto positivo en el tamaño final de los microbulbillos. Al comparar los tratamientos de mayor concentración (10 y 15%), se obtuvo un valor del DM ligeramente superior para el tratamiento del 10% en el clon Criollo y no se observaron diferencias para el clon Chileno y el Vietnamita.

La Figura 2 que representa el peso de los bulbillos al final del precultivo, indica un comportamiento congruente con el resultado anterior, para los clones Criollo y Vietnamita. Aunque algunas diferencias no llegaron a ser significativas, se observó, como tendencia, que los tratamientos con el subcultivo previo en sacarosa al 3% desarrollaron bulbillos de menor

peso que los sembrados directamente en 10 y 15%. En estos clones, el tratamiento que desarrolló el mayor peso de los microbulbillos fue la siembra directa en sacarosa al 10%. En el caso del tipo Chileno no se observó diferencia entre las concentraciones. Las diferencias entre los genotipos, son esperadas ya que son clones con distinto comportamiento *in vitro*.

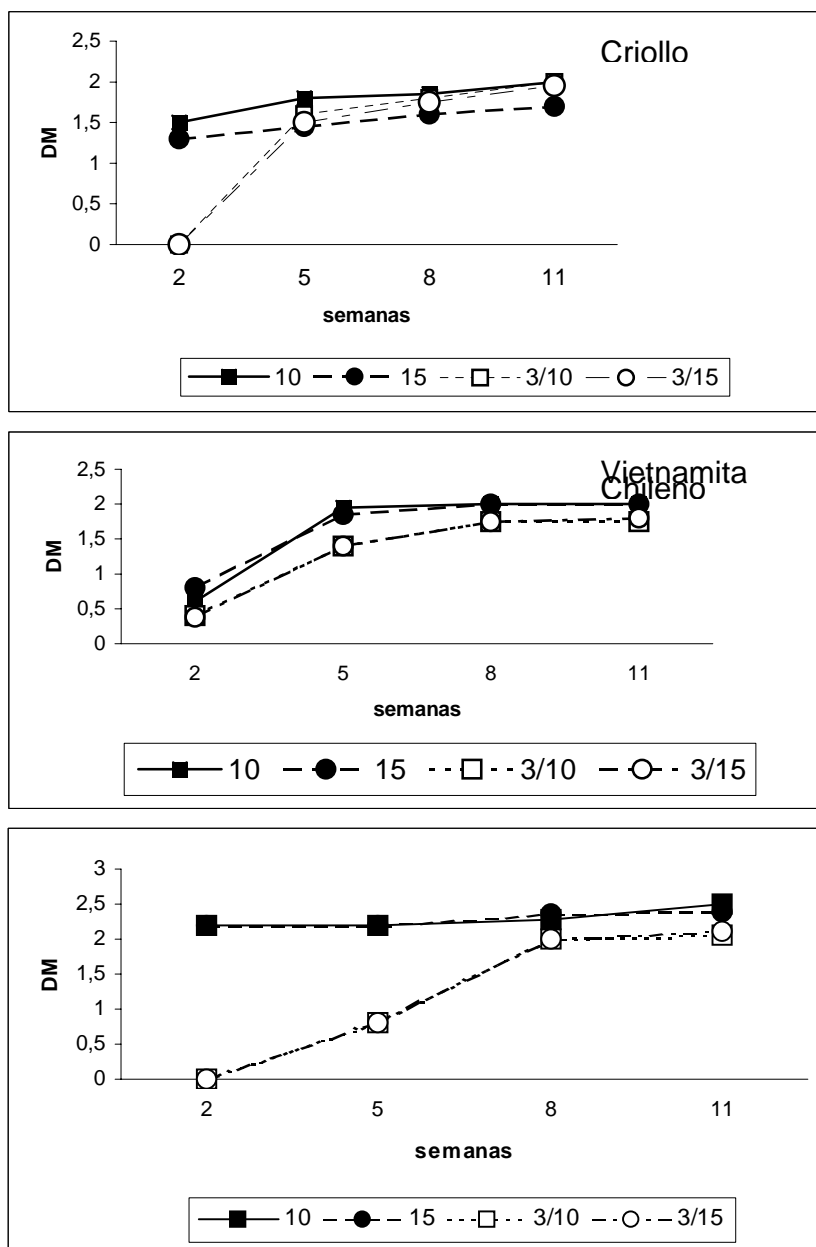


Fig. 1. Desarrollo de los microbulbillos (DM) de los clones Criollo, Vietnamita y Chileno en diferentes concentraciones de sacarosa durante el precultivo ($24\pm 2^\circ\text{C}$, antes de la conservación a $5-6^\circ\text{C}$). (DM: valor promedio según la escala: $1 < 0.5$; 2: $0.5-1\text{cm}$; 3: $>1\text{cm}$ de diámetro).

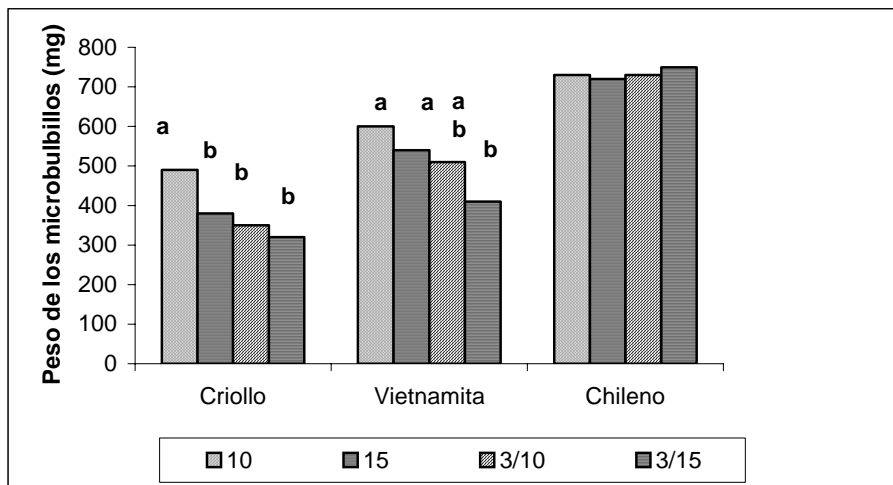


Fig.2. Peso de los microbulbillos de los clones Criollo, Chileno y Vietnamita en diferentes concentraciones de sacarosa al final del precultivo.
(letras iguales no difieren significativamente entre sí para $p < 0,01$)

El análisis de las Figuras 1 y 2 permiten concluir que la variante de la siembra directa en sacarosa al 10% fue superior o similar, en la comparación con el resto de los tratamientos.

Keller y Lesemann (1997) establecieron una fase de dos meses de precultivo en medio enriquecido con sacarosa al 15%, a la temperatura de 25°C, previo a la conservación *in vitro* a 3°C del ajo y la cebolla, en el Banco de Germoplasma de Gatersleben, Alemania. El resultado obtenido en el presente trabajo es similar al obtenido por los autores anteriormente citados, en cuanto al efecto favorable del precultivo en sacarosa, a las temperaturas relativamente altas del cuarto de cultivo para inducir la bulbificación, aunque en este caso la concentración del 10% de sacarosa resultó más favorable que la del 15%.

La Figura 3 muestra que, de modo general, el subcultivo en sacarosa al 3% (3/10 y 3/15), favoreció el desarrollo foliar dado por el número de hojas, principalmente para el tipo Criollo. Respecto a la altura de las plantulas, los tratamientos presentaron un comportamiento similar al observado respecto al número de hojas (no se muestran los datos). Sin embargo, los tratamientos 3/10 y 3/15, como se indicó tuvieron menor desarrollo del microbulbillo, dado por las dimensiones del diámetro (DM) y el peso. Esto indica que en las condiciones *in vitro* el desarrollo del bulbillo dependió principalmente de la concentración de sacarosa adicionada al medio de cultivo, y que las reservas de nutrientes acumuladas en las hojas no fueron determinantes en el crecimiento del bulbo.

En la Tabla 4 se aprecia que el tratamiento de cultivo directamente sobre medio MS con la adición del 10% de sacarosa fue el que permitió obtener mayores porcentajes de brotación al final de la conservación. Este es un aspecto importante para la regeneración de la muestra, ya que si la brotación es heterogénea, y parte de los bulbillos que constituyen la accesión permanecen en estado de dormancia o pierden la viabilidad, pudiera disminuir el número de réplicas disponibles para el segundo ciclo de conservación *in vitro*.

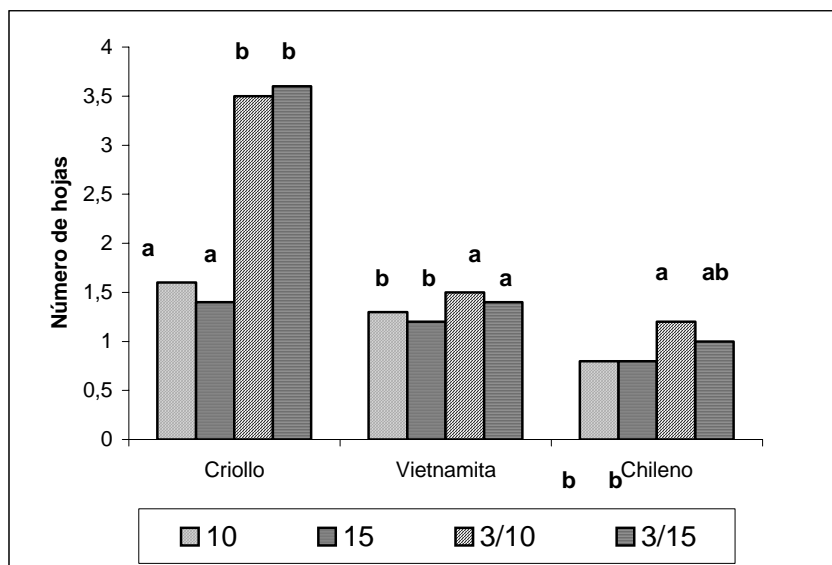


Fig. 3 Desarrollo foliar dado por el número de hojas a las 8 semanas de precultivo (*letras iguales no difieren significativamente entre sí para $p < 0,01$*)

Mujica y Mogollón (2004) quienes estudiaron el efecto de la sacarosa combinada con diferentes reguladores del crecimiento, sobre la bulbificación *in vitro* de ajo, señalaron que la sacarosa en bajas concentraciones, actúa estimulando la división y la elongación celular. Consideraron como otra posible explicación el hecho de que la sacarosa es hidrolizada extracelularmente a glucosa y fructosa, debido a la enzima invertasa ácida asociada con la pared celular, la cual puede ser secretada por el tejido de los microbulbillos hacia el medio de cultivo.

Tabla 4. Porcentajes de brotación para los diferentes tratamientos y clones evaluados.

Tratamientos	Concentración de sacarosa (%)	Porcentaje de brotación (%)		
		Criollo	Chileno	Vietnamita
1	10	94,7	84,2	95
2	15	71,4	47,8	56,3
3	3/10	90,5	78,9	71,4
4	3/15	100	80	50

Los resultados expuestos permiten resumir que una vez que se ha logrado el establecimiento *in vitro*, el explante debe transferirse directamente a medio enriquecido en sacarosa al 10%, para

inducir la bulbificación, sin intercalar un subcultivo en sacarosa al 3%, ya que el mismo extiende el período necesario para alcanzar la bulbificación, sin favorecer el desarrollo de los microbulbillos, dado por un aumento en el tamaño o el peso

CONCLUSIONES

- La variante de precultivo consistente en la siembra directa del ápice en medio BDS enriquecido con 10% de sacarosa (en condiciones de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminación) produjo los microbulbillos de mayor diámetro y peso; y en general, mayor porcentaje de brotación al final de la fase de conservación.
- En las condiciones *in vitro* el desarrollo del bulbillo dependió principalmente de la sacarosa adicionada al medio, sin que se encontrara relación en cuanto al desarrollo de las hojas (número de hojas y altura de las plantas) y el crecimiento del bulbo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chan, K. C.; M. C. Yin. y W. J. Chao (2007): Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 45 (3): 502-507.
- Devrim, E. y I. Durak (2007): Is garlic a promising food for benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(11): 1319-1323.
- Dustan, D. I. y K. C. Short (1977): Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.*, 41: 70-72.
- 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.
- 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.
- 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 Sec. IL: Burba and C.R. Galmarini Acta Hort.*, 433. ISHS 1997.
- Kojuri, J.; A. R. Vosoughi y M. Akami (2007): Effects of *Anetum graveolens* and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Lipids Health Dis.* Mar., 1(6) 5.
- Mujica, H. y N. Mogollón (2004): Bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) Con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*, v.16 n.1 Barquisimeto
- Mujica, H. M. E. Sanabria; N. Mogollón y Y. Peroso (2008): Formación *in vitro* del bulbo del ajo morado (*Allium sativum* L.). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 25: 197-210.
- Murashige, T.; F. Skoog (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Rahman, K. (2007): Effects of garlic on platelet biochemistry and physiology. *Mol. Nutr. Food Res.* Nov., 51 (11): 1335-1344.
- Setiawan, V. W.; G. P. Yu y Q. Y. Lu (2005): *Allium* vegetables and stomach cancer risk in China. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 6 (3): 387-395.

- 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.
- Stavělíková, H. (2008): Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection-Information. *Hort. Sci. (Prague)*, 35 (3): 130-135.
- 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.; 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.