

MICROPROPAGACIÓN DE GERMOPLASMA CONSERVADO DE AJO (*Allium sativum* L.).

María de los Ángeles Torres Mederos, Ana Julia Rodríguez Mansito, Adriana Torres
Martínez y Odalys Llorente Osorio.

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

INTRODUCCIÓN

El ajo cultivado es una planta estéril que sólo se propaga asexualmente (Rabinowitch y Kamenetsky, 2004). 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.

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° emergieron espontáneamente, una vez que alcanzaron una altura aproximada de 5 cm o más. Para su extracción se realizó un corte longitudinal al microbulbillo, cuidando de no dejar al descubierto el 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 indol-acético (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) + 1.6 µM 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 ultimo 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. La estructura observada guarda una notable similitud con la vara floral (denominada escapo) y la estructura globosa (contentiva de los bulbillos) característica de los ecotipos de ajo denominados de “cuello duro” (hardneck) cultivado en regiones de clima frío. 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).

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

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).

La manifestación de la hiperhidricidad se observó 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

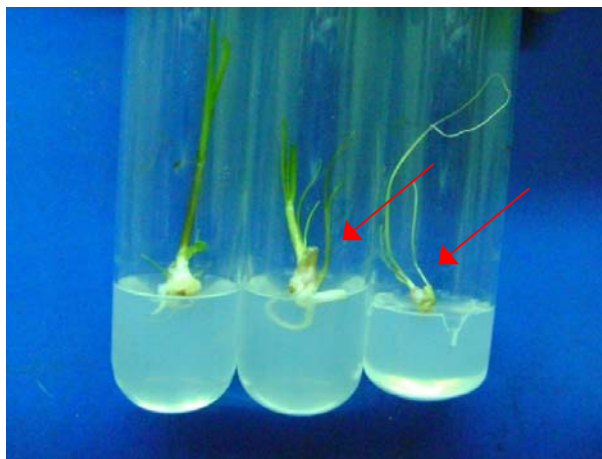


Figura 1. P2: 1 μM de AIA +1 μM de BAP por un mes, seguido de 5 μM de ANA +10 μM BAP (Nagakubo *et al.*, 1997)

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

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, 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 hiperhídricidad.

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 P1. El tratamiento P2, 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

- 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.
- 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 Microprogación 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.
- 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.