

Establecimiento de plántulas *in vitro* de clones de ajo peruano (*Allium sativum* L.)

Leidy López Quintero¹, Hugo Escobar Velásquez¹ y Madeleyne Parra Fuentes^{1*}

¹Universidad Jorge Tadeo Lozano, Centro de Bio-Sistemas, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Grupo de investigación Desarrollo en Horticultura Sostenible. Chía, Cundinamarca. *Autor para correspondencia: mparrafuentes@gmail.com

Establishment *in vitro* plants of garlic peruvian variety (*Allium sativum* L.)

Abstract

The *in vitro* establishment of two peruvian garlic clones was evaluated through the use of standardized process of disinfection and *in vitro* introduction of garlic meristem clones national. The use of calcium hypochlorite (1 g.L⁻¹) and sodium hypochlorite (0.1%) as disinfectants garlic bulblets was validated, allowing the complete elimination of the microorganisms present in the explants and a viability of 66.3 and 64.5% in the P-007A and P-007B clones. The *in vitro* culture was performed on MS basal media containing 0.5 mg L⁻¹ naphthalene acetic acid (NAA) and 0.64 mg.L⁻¹, 2-Isopentyl adenine (2iP), where the P-007A clone seedling development 15mm and 2.52 leaves, whereas in P-007B clone seedling were 13.6mm and 2.16 leaves. Seedlings established Peruvian garlic clones managed development parameters in the establishment phase of the species

Keywords: naphthaleneacetic acid, *in vitro* culture, 2-isopentyl adenine, validation.

Editor: Hernández-Fernández J.

Citation: López L, Escobar H y Parra M. (2014). *Establecimiento de plántulas in vitro de clones de ajo peruano (Allium sativum L.)*. Revista Mutis 4(1); pag. 62-66

Received: May 5, 2014; **Accepted:** June 15, 2014; **Published on line:** June 30, 2014

Copyright: ©2014 López *et al.* This is an open-access article, which permits unrestricted use, distributions and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Competing Interests: The authors have no conflict of interest.

Resumen

Se evaluó el establecimiento *in vitro* de dos clones de ajo peruano mediante el uso de procesos estandarizados de desinfección e introducción *in vitro* de meristemas de ajo de clones nacionales. Se validó el uso de hipoclorito de calcio (1 g.L⁻¹) e hipoclorito de sodio (0.1%) como desinfectantes, permitiendo la eliminación total

de los microorganismos presentes en los explantes y una viabilidad del 66.3 y 64.5% en los clones P-007A y P-007B. El establecimiento *in vitro* de las plántulas se realizó en medio de cultivo MS con 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalen acético (ANA) y 0,64 mg.L⁻¹ de 2-Isopentil adenina (2ip), donde el clon P-007A desarrollo plántulas de 15mm con 2.52 hojas, mientras en el clon P-007B las plántulas tenían 13.6mm con 2.16 hojas. Las plántulas establecidas de ajo de los clones peruanos lograron los parámetros de desarrollo indicados para la etapa de establecimiento de la especie.

Palabras claves: ácido naftalen acético, cultivo *in vitro*, 2-Isopentil adenina, validación.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* L) se caracteriza por poseer sustancias nutritivas como calcio, hierro y vitamina C (Sou-



ci *et al.*, 1994). Por sus características organolépticas es apetecido a nivel culinario, agroindustrial y medicinal (Parra, 2006). El ajo no posee semilla botánica, reproduciéndose vegetativamente mediante bulbillos que favorecen la transmisión y acumulación de microorganismos patógenos, lo que ha causado la desaparición como cultivo en Colombia en los últimos 15 años, situación que ha implicado que se importe más del 90% del producto para consumo interno (Pinzón, 2009).

Debido a la importancia que tiene el ajo en la canasta familiar y a la alta demanda que presenta en la actualidad, surge la necesidad de reproducir cultivos de alta calidad, libres de plagas y enfermedades, que permitan mejorar la producción. En busca de soluciones a estas exigencias surge como una alternativa o herramienta viable el cultivo *in vitro* de tejidos utilizando explantes sanos, con el fin de obtener material vegetal libre de enfermedades.

Este trabajo evaluó el comportamiento de clones peruanos de ajo durante la etapa de establecimiento *in vitro* utilizando un método estándar para clones nacionales.

Materiales y métodos

Las condiciones utilizadas en los procesos de desinfección e introducción de los clones peruanos de ajo fueron estandarizadas para clones nacionales de ajo por Bustamante y Parra (2010), en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Bio-Sistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

Selección del material donante

Se seleccionaron bulbillos de ajo de los clones P-007A y P-007B procedentes de plantas con características agronómicas de interés comercial. Los bulbillos se encontraban libres de signos o síntomas de enfermedades, así como de daño mecánico o por impacto físico.

Desinfección

Los bulbillos se desinfectaron con solución jabonosa al 10% durante 5 min, etanol al 70% durante 30 seg, hipoclorito de calcio (1 g.L^{-1}) por 10 min e hipoclorito de sodio (0.1%) durante 15 min. Después de cada desinfectante, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Finalmente, los explantes fueron dejados en timsen (1 g.L^{-1}) hasta la extracción del meristemo.

Introducción de meristemas y medio de cultivo

Bajo condiciones de asepsia se realizó la extracción del meristemo con uno ó dos primordios foliares. El tamaño fue de aproximadamente 0.5-2mm. Se realizaron dos introducciones por clon y se sembró un meristemo por tubo de ensayo con medio de cultivo. Se sembraron 50 meristemas por introducción. Los meristemas se inocularon asépticamente en medio de cultivo formulado con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y suplementado con 80 mg.L^{-1} de hemisulfato de adenina, 0.5 mg.L^{-1} de ácido naftalen acético (ANA), 0.64 mg.L^{-1} de 2-Isopentil adenina (2ip), 3% de sacarosa y 9.5 g.L^{-1} de agar PTC (PhytoTechnology Laboratories). El desarrollo de los explantes se realizó en cuarto de crecimiento a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

Análisis estadísticos

A las 5 semanas del inicio del cultivo se estableció para cada clon el porcentaje de contaminación y de viabilidad o regeneración de plántulas. Se evaluaron las variables número de hojas, longitud y presencia de raíces en 25 plántula, por cada introducción seleccionadas al azar. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el comportamiento entre los clones peruanos. Los resultados del ANOVA se compararon con la respuesta presentada por el clon de origen nacional N-003, bajo las mismas condiciones de cultivo.

Resultados y discusión

El tratamiento de los explantes con hipoclorito de calcio (1%) e hipoclorito de Sodio (0.1%) durante 10 y 15 minutos, respectivamente, permitió una eliminación total de los microorganismos contaminantes de los clones peruanos evaluados. Los métodos de desinfección pueden excluir todos los microorganismos no infecciosos asociados a la superficie, este aspecto es importante debido a que todos los medios de cultivo empleados son ricos en nutrientes que facilitan el crecimiento de bacterias y hongos (Dodds y Roberts, 1986).

El tamaño del meristemo (explante) de ajo sembrado de 0.5-2 mm (Figura 1), presenta gran influencia en la limpieza del material vegetal, debido a que entre más pequeño sea el explante menor es el riesgo de contaminación (Pérez, 1998).

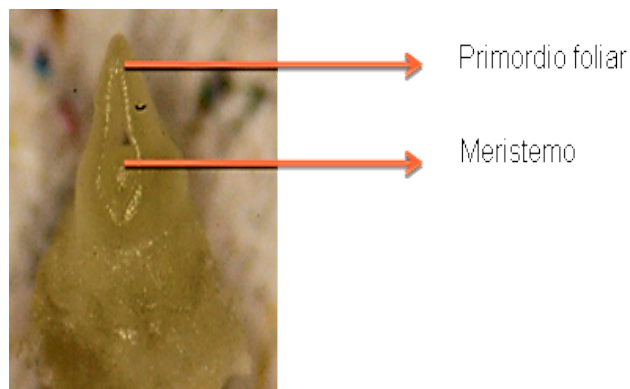


Figura 1. Estructura meristemática de ajo con el último primordio foliar. Tamaño aproximado de 0.2 mm. Observación en estereoscopio (10X)

Viabilidad de los explantes

El protocolo de desinfección permitió para los clones P-007A y P-007B una viabilidad del 66.3 y 64.5%, respectivamente. El clon N-003 obtuvo una viabilidad del 76.3% (Figura 2).

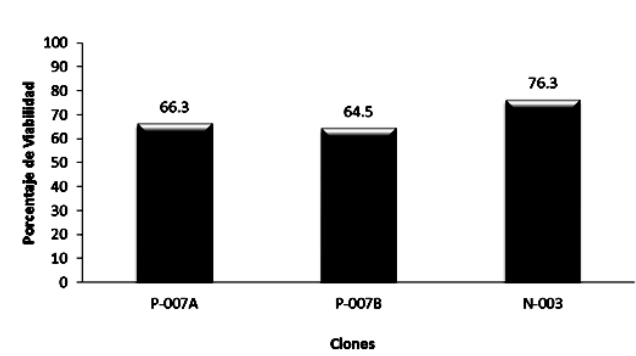


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de meristemos de ajo de los clones peruanos P-007A y P-007B comparado con el clon nacional N-003.

Las pérdidas presentadas por los clones pudieron deberse a la realización de un corte muy cerca del meristemo durante la preparación previa a la desinfección, la cual permitió el ingreso de los desinfectantes al domo apical afectando el tejido. Además, la eliminación de más del 30% del disco basal, por falta de habilidad o mala manipulación, durante los cortes de extracción es un factor que contribuye a la muerte de los explantes y disminuye los porcentajes de viabilidad.

Chaparro (1998) obtuvo 70 y 50% de viabilidad, así como 100 y 80% de explantes libres de contaminación en ajo Rubí-1 al usar hipoclorito de sodio al 1% por 15 a 20 minutos, logrando mayor viabilidad y efectividad de desinfección con menor tiempo de exposición.

Se observa que las diferentes concentraciones y tiempos de exposición de los desinfectantes afectan la viabilidad de los explantes y la eliminación de los microorganismos, obteniéndose comportamientos diferentes entre clones. Es importante realizar evaluaciones para determinar el tratamiento más favorable para cada clon o variedad (Parra, 2006).

Desarrollo de las plántulas

Se observó el desarrollo de las plántulas durante 5 semanas de crecimiento (Figura 3), todas las plántulas presentaban un color verde brillante y en algunos explantes hubo formación de tejido calloso de color amarillo pálido en la base. Otra característica evidente en todas las plántulas establecidas fue la ausencia de desarrollo radicular, factor relacionado con la presencia y concentración de reguladores tipo citoquinina en el medio de cultivo que inhiben la formación de raíces (Pierik, 1990 y Botti, 1992).

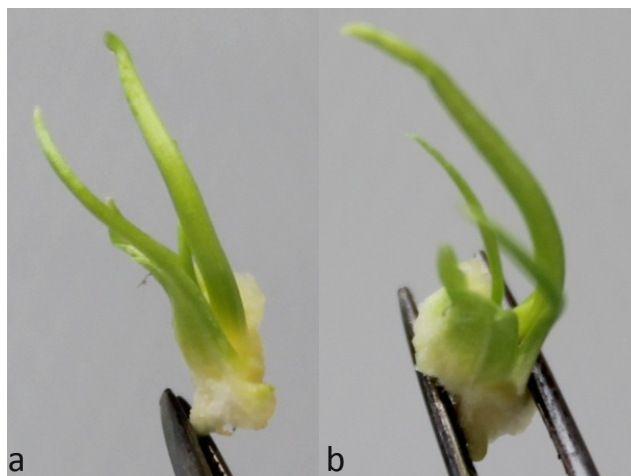


Figura 3. Plántulas establecidas de clones peruanos de ajo. Presentan desarrollo foliar superior a 2 hojas y longitud superior a 1 cm, A. Clon P-007A y B. Clon P-007B.

El análisis estadístico presentó diferencias significativas entre los clones peruanos para la formación de hojas durante la fase de establecimiento ($P = 0.0204$ y $F = 5.55$), mostrando el clon P-007A una mejor respuesta fisiológica que el clon P-007B. El clon P-007A obtuvo un promedio de crecimiento de 2.52 hojas y el clon P-007B de 2.16. La respuesta del clon P-007A es similar a la presentada por el clon N-003 (Figura 4).

El uso de fitoreguladores ha permitido la obtención de un número variable de hojas en plántulas establecidas de ajo. Se ha descrito el desarrollo de plántulas de ajo criollo morado con dos hojas en medio de cultivo MS libre de reguladores de crecimiento (Torres, 2013), así como el desarrollo de plántulas de ajo criollo y Rubí-1 con 1.41 y 1.18 hojas, respectivamente usando medio MS con la adición de 0.1 mg.L^{-1} de AIA ó ANA y 0 ó 0.1 mg.L^{-1} de KIN (Parra, 2006).

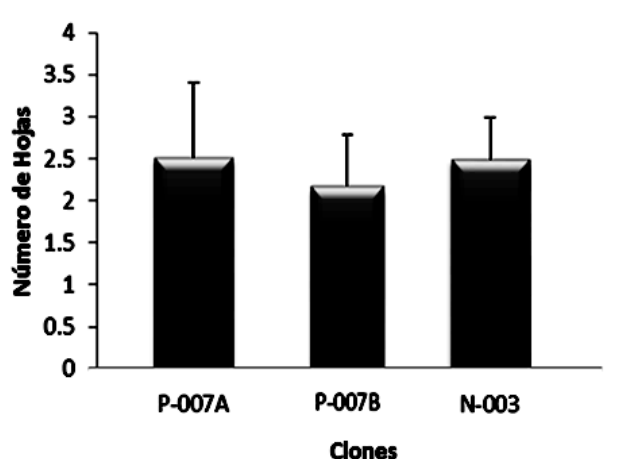


Figura 4. Promedio de hojas desarrolladas durante el establecimiento *in vitro* de los clones peruanos, P-007A y P-007B y el clon nacional N-003. Para los clones P-007A y P-007B, el coeficiente de variación fue de 35.16 y 28.61 respectivamente.

El análisis estadístico de la variable longitud de plántulas mostró que no existen diferencias significativas en la respuesta de los clones P-007A y P-007B ($P = 0.335$ y $F = 0.94$). Las plántulas del clon P-007A alcanzaron 4 a 40 mm de altura con un promedio de 15 mm, mientras que las de clon P-007B tenían entre 4 a 32 mm con un promedio de 13.6 mm. Nuevamente, el clon P-007A presentó una respuesta idéntica al clon nacional N-003 (Figura 5).

En plántulas de ajo morado Barranquino producidas a partir de meristemos, el uso de medio MS modificado (doble concentración de micronutrientes) con 0.3 mg.L^{-1} de BAP y 0.15 mg.L^{-1} de ANA produjo una altura de plántula de 66.45 mm, respuesta dada por la mayor concentración de micronutrientes y no por la influencia de reguladores de crecimiento (Carhuaricra et al., 2012). El uso del medio MS con 0.5 mg.L^{-1} de BAP y 0.1 mg.L^{-1} de ANA en el establecimiento de diversos cultivares de ajo logró el desarrollo de plántulas con 50 a 60 mm de longitud en un período de ocho a diez semanas de cultivo (Olivera, 2009).

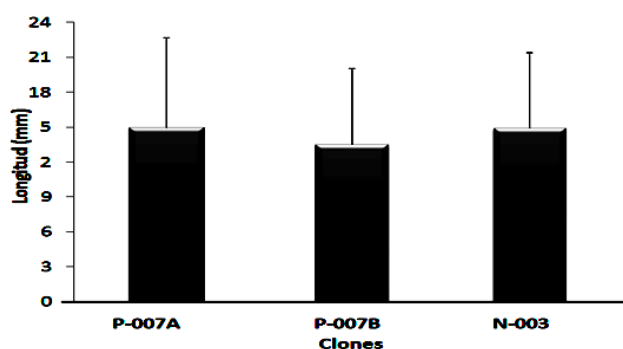


Figura 5. Promedio del crecimiento en longitud de las plántulas establecidas *in vitro* de los clones peruanos, P-007A y P-007B, y el clon nacional N-003. Para los clones P-007A y P-007B el coeficiente de variación fue de 51.19 y 47.99 respectivamente.

Conclusiones

Se validó el uso del protocolo de establecimiento de ajo del clon nacional N-003 bajo condiciones de cultivo *in vitro* para los clones peruanos P-007A y P-007B. El procedimiento para la desinfección de clones nacionales de ajo (*Allium sativum*), que incluye el uso de hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio, es adecuado para lograr un cultivo aséptico en el establecimiento *in vitro* de los clones de ajo peruano P-007A y P-007B. La validación del protocolo de desinfección garantizó la obtención de buenos resultados durante la etapa de establecimiento evitando pérdidas por contaminación o afección de los explantes a los desinfectantes. El medio de cultivo con sales MS al 100% suplementado con 0.5 mg.L^{-1} de ANA y 0.64 mg.L^{-1} 2ip permite el establecimiento adecuado de plántulas *in vitro* de los clones de ajo peruano P-007A y P-007B, alcanzando un desarrollo conforme a los parámetros determinados para la etapa de establecimiento de la especie.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, financiador del proyecto “Mejoramiento de la competitividad del ajo en Colombia mediante el ajuste participativo de tecnologías disponibles para la obtención y comercialización de semillas garantizadas”, contrato 222-2000N62444-6811.

Referencias

- Botti, C. (1992). Seminario sobre la producción de plantas *in vitro*. Quito, p. 22-24
- Bustamante, M., & Parra F., M. (2010). Protocolo de establecimiento *in vitro* de clones nacionales de ajo. Documento técnico del Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Informe de práctica profesional. Centro de Bio-Sistemas, Universidad Jorge Tadeo Lozano. 6 p.
- Chaparro, C. (1998). *Avances en la estandarización de la metodología para el cultivo "in vitro" de Allium sativum var. Rubi-1*. Mosquera: Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias.
- Carhuaricra, K., Olivera, J., Gonzales, J., & Rodríguez, J. (2012). Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad morado Barranquino. *Revista Peruana de Biología*, 19(3), 341-344.
- Dodds, H. J., & Lorin, W. R. (1985). *Experiments in plant tissue culture* (2 ed.). New York: Cambridge University Press.
- Olivera, J. 2009. Técnica de producción de semilla genética y básica de ajo (*Allium sativum* L.) libre de virus. *Folleto técnico* 6(9), 2-10.
- Parra F., M. (2006). *Desarrollo de tecnologías para la producción de semilla pre básica indexada de Ajo (Allium sativum, L.) var. Rubi-1 y Criollo en el laboratorio de Micropropagación de plantas de CORPOICA C.I Tibaitatá del municipio de Mosquera-Cundinamarca*. (Tesis Pregrado).
- Pérez, J. N. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara, Cuba: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Pierik, R. L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Ediciones Mundi-prensa.
- Pinzón, H. (2011). Los cultivos de cebolla y ajo en Colombia: Estado del Arte y perspectivas. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(1).
- Souci, S.W., Fachmann, W., & Krant, H. (2000). *Food composition and nutrition tables* (6 ed.) (pp. 873–1071). Stuttgart, Alemania: Medpharm Scientific Publication, CRC Press. Disponible en: <<http://www.sfk-online.net/cgi-bin/sfkstart.mysql?language=english>>
- Torres L., E. (2013). Metodología para la propagación masiva de semilla de ajo (*Allium sativum* L.) libre de enfermedades, vía cultivo de tejidos. (Tesis Doctoral).