

CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE MICROBULBOS DE AJO (*Allium sativum* L.)

Adriana Pardo¹, Susana Rivero¹ y Geine Alvarado¹

RESUMEN

Con el objeto de establecer un protocolo de conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo en *Allium sativum*, se almacenaron microbulbos en cinco medios de conservación: T₁= MS con 45 g·L⁻¹ de sacarosa, T₂= ½ MS con 45 g·L⁻¹ de sacarosa, T₃= ½ MS, T₄= ¼ MS con 45 g·L⁻¹ de sacarosa y T₅= ¼ MS, todos con 8 g·L⁻¹ de agar. Se aplicó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 30 unidades experimentales por tratamiento. Las variables de sobrevivencia y vigor de los microbulbos, regeneración de brotes y de raíces, altura de brotes (cm), número de brotes y número de hojas emergentes de los microbulbos fueron evaluadas mensualmente por un período de 210 días, mientras que el peso y diámetro de los microbulbos fue determinado al final del experimento. Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para sobrevivencia y vigor así como para las variables relacionadas con el follaje, mientras que para peso y diámetro del bulbo se utilizó Anavar y prueba de Tukey. Los microbulbos cultivados en el medio ¼ MS con 45 g·L⁻¹ de sacarosa mostraron los mayores promedios de sobrevivencia, vigor, peso y diámetro a los 7 meses. El almacenamiento durante ese tiempo bajo condiciones de crecimiento mínimo sin necesidad de realizar nuevos subcultivos ayudaría a disminuir los costos por mano de obra e insumos requeridos para la elaboración del medio. Por su parte, los medios con ½ MS y MS, ambos con 45 g·L⁻¹ de sacarosa, podrían ser empleados para conservar los microbulbos por períodos inferiores a los 120 días. En los medios ½ y ¼ MS sin sacarosa (T₃ y T₅) hubo menores valores de sobrevivencia, regeneración de brotes, vigor y altura de brotes. Los resultados indican que el medio ¼ MS con sacarosa puede ser utilizado para preservar la biodiversidad del clon 'Boconó' con fines de mejoramiento genético.

Palabras clave adicionales: Crecimiento mínimo, cultivo de tejidos, microbulbificación

ABSTRACT

In vitro conservation of microbulbs in garlic (*Allium sativum* L.)

With the objective of establishing a minimal growth protocol for *Allium sativum* preservation, microbulbs were stored in the following five preservation media: T₁= MS with 45 g·L⁻¹ sucrose, T₂= ½ MS with 45 g·L⁻¹ sucrose, T₃= ½ MS, T₄= ¼ MS with 45 g·L⁻¹ sucrose, and T₅= ¼ MS; all treatments with 8 g·L⁻¹ agar. A completely randomized design with 5 treatments and 30 experimental units per treatment was employed. Variables such as survival and vigor of microbulbs, shoot and root regeneration, shoot height, number of shoots per microbulb, and number of leaves per microbulb were evaluated at monthly intervals for 210 days, while microbulb weight and diameter were determined at the end of the experiment. Survival, vigor and foliage-related variables were analyzed by Kruskal-Wallis and multiple range comparison, while Anova and Tukey test were used for bulb weight and diameter. Microbulbs cultured in medium ¼ MS with 45 g·L⁻¹ sucrose showed highest mean survival, vigor, weight and diameter, up to 210 days. Storage during that time under conditions of minimal growth without the need for new subcultures would help to lower costs for labor and supplies required for medium preparation. On the other hand, media such as ½ MS or MS, both with 45 g·L⁻¹ sucrose, may be used to preserve microbulbs for periods lower than 120 days. In the ½ and ¼ MS media without sucrose (T₃ and T₅) there were lower values of survival, shoot regeneration, vigor and shoot height. Results showed that medium ¼ MS with 45 g·L⁻¹ sucrose can be useful for biodiversity preservation of the clone 'Boconó' for breeding purposes.

Additional key words: Tissue culture, minimal growth conditions, microbulbification

INTRODUCCIÓN

El mantenimiento o preservación de la biodiversidad agrícola representa un componente clave para el desarrollo agrícola sustentable y la seguridad alimentaria global. En tal sentido, la

conservación *in vivo* de materiales vegetales requiere de disponibilidad económica, tiempo y esfuerzo humano para realizar las labores en campo, así como también se deben considerar los posibles riesgos o pérdidas que puedan sufrir las colecciones por factores climáticos adversos o el

Recibido: Diciembre 13, 2013

Aceptado: Mayo 23, 2014

¹ Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". e-mail: apardo@ucla.edu.ve; susana_2610@hotmail.com; geinealvarado@gmail.com

ataque de plagas y enfermedades asociadas a los cultivos (Engelmann, 1998; Abdelali et al., 2008). La mayor parte de las plantas cultivadas son almacenadas en bancos de germoplasma en forma de “semilla botánica”, lo que se traduce en una limitante para especies de propagación vegetativa como el ajo (*Allium sativum*) que no forman semillas o una vez formadas resultan inviábiles o estériles. Debido a esto, el almacenamiento bajo condiciones de crecimiento mínimo (conservación *in vitro*) y la criopreservación constituyen la única vía para mantener la biodiversidad en especies estrictamente apomícticas como el ajo (Keller et al., 2006; Robledo y Tovar, 2012). En años recientes, la criopreservación ha sido utilizada en un amplio rango de especies cultivadas (Engelmann, 2000; Sudarmonowati, 2000; Kim et al., 2007); sin embargo, el éxito de esta técnica depende de diversos factores como por ejemplo, evitar el congelamiento letal de las células así como la deshidratación extrema de los tejidos. En el caso de la conservación bajo condiciones de crecimiento mínimo se hace uso de las técnicas del cultivo de tejidos para propagar y producir gran cantidad de material libre de enfermedades, facilitando con ello el mantenimiento de colecciones de germoplasma en condiciones controladas de laboratorio, garantizando a su vez la estabilidad y/o integridad genética de los materiales a ser utilizados por productores, fitomejoradores o coleccionistas (Engelmann, 1998; Malaurie, 2001).

Dado que en Venezuela no se cuenta con una “semilla” certificada que permita la creación de un banco de germoplasma a gran escala, en esta investigación se planteó como objetivo la conservación de microbulbos de ajo, clon ‘Boconó’ bajo condiciones de crecimiento mínimo. Para ello se determinó la influencia sobre los microbulbos procedentes del cultivo de tejidos de diferentes concentraciones del medio Murashige y Skoog, así como de la presencia o ausencia de sacarosa en los medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología del Postgrado de Horticultura del Decanato de Agronomía, de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), en

Cabudare, estado Lara, Venezuela.

Se utilizaron microbulbos de ajo del ‘Clon Boconó’ provenientes del cultivo *in vitro*, con un peso entre 0,6 y 0,8 g y diámetro ecuatorial comprendido entre los 0,5 a 1 cm. Para alcanzar la fase de bulbificación, los brotes procedentes de ápices caulinares fueron cultivados en medio MS con 90 g·L⁻¹ de sacarosa más 2 mg·L⁻¹ de 2-isopentenyl adenine (2ip) y 8 g·L⁻¹ de agar de acuerdo al protocolo de Mujica y Mogollón (2004).

El protocolo empleado para la conservación bajo crecimiento mínimo fue el utilizado en *A. comosus*, *Billbergia rosea* y *Vriesea splendens* (Zee y Munekata, 1992; Pardo et al., 2008; 2010). El medio Murashige y Skoog (MS) se preparó manteniendo la concentración total de los componentes: tiamina-HCl (30 mg·L⁻¹), glicina (2 mg·L⁻¹), ácido nicotínico (10 mg·L⁻¹), piridoxina (1 mg·L⁻¹) e inositol (100 mg·L⁻¹); el pH se ajustó a 5,8 ± 0,1. Se conformaron cinco tratamientos de la siguiente manera: T₁ (MS + 45 g·L⁻¹ de sacarosa), T₂ (½ MS + 45 g·L⁻¹ de sacarosa), T₃ (½ MS), T₄ (¼ MS + 45 g·L⁻¹ de sacarosa) y T₅ (¼ MS), todos con 8 g·L⁻¹ de agar.

Los microbulbos se cultivaron en tubos de ensayo de 25 x 150 mm con 10 mL⁻¹ de medio y se mantuvieron durante siete meses, sin subcultivo, en un ambiente controlado en cuarto de crecimiento con temperatura de 25 ± 2 °C, iluminación de 13,5 μmol·m⁻²·s⁻¹ y fotoperíodo de 16 horas. Se aplicó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos, 30 unidades experimentales por tratamiento representadas por un microbulbo por tubo de ensayo. Las variables evaluadas por un período de siete meses (30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 días) fueron: porcentaje de sobrevivencia y vigor de microbulbos, regeneración de brotes y regeneración de raíces, altura de brotes (cm), número de hojas/brote y número de brotes emergentes de los microbulbos. La sobrevivencia se determinó como el porcentaje de plantas que permanecieron viables hasta el final del experimento. Así mismo, se evaluó el vigor de los microbulbos a los 150, 180 y 210 días, empleando una escala numérica arbitraria del 1 al 4: De acuerdo a ésta: 1= bulbos definidos en un 75 %; 2 = bulbos definidos en un 50 %; 3 = bulbos definidos en un 25 % y 4 = ausencia de bulbos o bulbos no definidos (Figura 1). Se determinó el peso (g) y el diámetro ecuatorial de

los microbulbos (cm) al final del experimento (210 días).

La sobrevivencia y el vigor, así como las variables relacionadas con el follaje se procesaron por la vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) con la prueba de medias por comparación de rangos múltiples indicándose sus respectivos promedios, mientras que para el peso y el diámetro de los microbulbos se aplicó la prueba de Tukey. Se empleó el programa Statistix 8.0.



Figura 1. Escala de vigor empleada para microbulbos de ajo: 1= Bulbos definidos en un 75 %, 2 = Bulbos definidos en un 50 %, 3 = Bulbos definidos en un 25 % y 4 = Ausencia de bulbos o bulbos no definidos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el cultivo de microbulbos de *A. sativum* L. en cinco medios de conservación *in vitro*, aquellos almacenados en $\frac{1}{4}$ MS con $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa (T_4) mostraron porcentajes de sobrevivencia de 86,6, 76,6 y 73,3 % a los 150, 180 y 210 días, respectivamente. Por su parte, los microbulbos cultivados en MS y $\frac{1}{2}$ MS, ambos con $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa (T_1 y T_2), exhibieron porcentajes de sobrevivencia entre 83 y 73% a los 150 días y entre 66 y 65% a los 210 días, respectivamente. Contrariamente, en los medios $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ MS sin sacarosa (T_3 y T_5), los microbulbos

presentaron los menores promedios a los 210 días, con 40 y 30 % de sobrevivencia, respectivamente (Cuadro 1).

Para la variable regeneración de brotes a partir de microbulbos, la prueba de Kruskal Wallis conformó al menos cuatro grupos a partir de los 60 días (Cuadro 2). Los microbulbos cultivados en MS con sacarosa (T_1) presentaron un 90 % de brotes regenerados a los 60 días manteniéndose esta tendencia hasta los 210 días con un porcentaje de regeneración de 73,23. Seguidamente los tratamientos con $\frac{1}{2}$ MS y $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa (T_2 y T_4) mostraron 71,30 y 66 % de regeneración de brotes a los 210 días, respectivamente. Finalmente, los microbulbos cultivados en los medios $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$ MS sin sacarosa (T_3 y T_5), revelaron los menores porcentajes con 56,67 y 43,33% de regeneración de brotes al final del período de evaluación.

Cuadro 1. Sobrevivencia de los microbulbos en *Allium sativum* cultivados en diferentes medios y tiempos de conservación

Tratamiento	Sobrevivencia (%)		
	150 días	180 días	210 días
MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	121,42 a	118,50 ab	82,81 ab
$\frac{1}{2}$ MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	101,85 ab	99,17 b	79,75 ab
$\frac{1}{2}$ MS	62,48 b	78,24 bc	41,32 b
$\frac{1}{4}$ MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	127,33 a	143,58 a	153,41 a
$\frac{1}{4}$ MS	44,14 c	34,45 c	33,23 c
Kruskal-Wallis	23,11*	33,83*	32,21*

Valores del rango con letras distintas son estadísticamente diferentes según comparación múltiple no paramétrica ($P \leq 0,05$)

Cuadro 2. Regeneración de brotes/microbulbos en *Allium sativum*, cultivados en diferentes medios y tiempos de conservación

Tratamiento	Regeneración de brotes/microbulbos						
	Días						
	30	60	90	120	150	180	210
MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	80,8	98,3 a	83,2 a	81,3 a	86,7 a	80,4 a	72,8 a
$\frac{1}{2}$ MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	67,2	55,9 bc	60,9 ab	69,2 ab	70,1 a	70,3 ab	64,7 a
$\frac{1}{2}$ MS	56,4	43,6 bc	65,8 ab	41,5 cd	41,2 bc	35,4 cd	33,9 bc
$\frac{1}{4}$ MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	67,3	64,5 b	43,9 c	45,8 bc	44,9 b	45,1 bc	39,2 b
$\frac{1}{4}$ MS	71,5	34,3 c	18,9 c	20,7 d	18,3 c	16,1 d	14,9 c
Kruskal-Wallis	5,35 ns	52,74*	54,54*	74,90*	67,40*	69,28*	59,64*

Valores del rango con letras distintas son estadísticamente diferentes según comparación múltiple no paramétrica ($P \leq 0,05$)

Similar a la sobrevivencia, los microbulbos cultivados en $\frac{1}{4}$ MS con $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa registraron el mejor vigor, con valores promedios de 1,16; 0,93 y 1,04 según la escala establecida a los 150, 180 y 210 días de evaluación, respectivamente. Seguidamente, los microbulbos en MS y $\frac{1}{2}$ MS con sacarosa presentaron valores entre 2,07 y 1,79 a los 180 días y de 1,59 y 1,13 a los 210 días, respectivamente; mientras que en aquellos cultivados en los medios sin sacarosa (T_3 y T_5) el vigor de los microbulbos osciló entre 2,71 y 2,85 a los 210 días (Cuadro 3).

Cuadro 3. Vigor de los microbulbos en *Allium sativum* cultivados en diferentes medios y tiempos de conservación

Tratamiento	Vigor		
	150 días	180 días	210 días
MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	109,42 ab	107,50 ab	83,90 ab
$\frac{1}{2}$ MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	103,58 ab	89,17 b	69,25 b
$\frac{1}{2}$ MS	71,58 b	68,42 bc	31,42 bc
$\frac{1}{4}$ MS + $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa	138,83 a	161,58 a	144,42 a
$\frac{1}{4}$ MS	34,00 c	25,42 c	31,42 c
Kruskal-Wallis	3,86*	7,52*	8,19*

Valores del rango con letras distintas son estadísticamente diferentes según comparación múltiple no paramétrica ($P \leq 0,05$)

De acuerdo a lo anterior, los máximos promedios para regeneración de brotes se observaron en los microbulbos cultivados en el medio MS con $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa a los 120 días del experimento (90,1), seguido por los medios $\frac{1}{4}$ MS y $\frac{1}{2}$ MS con sacarosa a los 60 días (86,67 y 80,0), es decir $T_1 > T_4 > T_2$, lo cual es indicativo de que los microbulbos de ajo requieren para su desarrollo de sales y azúcar en el medio nutritivo. Sin embargo, los microbulbos cultivados en el medio $\frac{1}{4}$ MS con $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa registraron, además de una regeneración de 66 % a los 210 días, los mayores promedios para la sobrevivencia y el vigor a los 150 y 180 días, respectivamente, lo cual resulta favorable para la conservación *in vitro* ya que bajo estas condiciones de almacenamiento se garantizaría una tasa mínima de crecimiento y/o regeneración hasta el final del experimento.

Investigaciones previas realizadas en diferentes

cultivos señalan la importancia de analizar las variables sobrevivencia y regeneración durante la conservación a gran escala de materiales vegetales (Chen et al., 2011; Keller et al., 2006; Keller y Senula, 2012). Al respecto, los porcentajes de sobrevivencia (73 %) y de regeneración (66 %) observados a los 210 días en el medio $\frac{1}{4}$ MS con sacarosa fueron similares a lo reportado en *A. sativum* por Yi et al. (2010) y en *Lilium* por Chen et al. (2011) quienes determinaron porcentajes de regeneración de 60 % y de 36 a 68 % y de sobrevivencia entre 43 a 83%, respectivamente.

En relación a la incorporación de sacarosa en el medio nutritivo, los resultados se corresponden a lo reportado en diversas especies como ajo (Barrueto et al., 1994; Keller et al., 2006, Yi et al., 2010), papa (Páez y González 2001), coco (Borges et al., 2008) y ñame (Borges et al., 2009), entre otras. Específicamente, Borges et al. (2008) y Borges et al. (2009), trabajando con 60 y $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa en coco y ñame, respectivamente, encontraron que la sacarosa favoreció la sobrevivencia de los materiales, lo cual demuestra que cada genotipo requiere de una concentración particular de este carbohidrato para una eficiente conservación *in vitro*.

Cabe destacar que la incorporación de $45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa en el medio nutritivo, bien sea en el medio con la concentración total de sales (T_1) ó a la mitad o un cuarto de su concentración (T_2 y T_4), permitió la diferenciación y crecimiento de órganos y tejidos de forma gradual y progresiva. Estos resultados sugieren que sólo en presencia de este carbohidrato los microbulbos como órganos de reserva realizaron una eficiente translocación de agua y nutrientes hasta la parte aérea, garantizando con ello los procesos fotosintéticos, así como el balance carbohidrato-sales necesario para el buen funcionamiento de los tejidos. Contrariamente, en los tratamientos sin sacarosa (T_3 y T_5), además de un mínimo promedio para las variables evaluadas, los microbulbos manifestaron deficiencias fisiológicas, poco vigor y colores blanquecinos. Igualmente, se evidenció la secreción de exudados amarillentos y el consumo de la totalidad de los medios nutritivos a partir de los 150 días. Lo anteriormente señalado resulta indeseable para la conservación *in vitro*. Similar a estos resultados, Yamagishi (1998) observó, en ausencia de sacarosa, la secreción de exudados amarillentos durante la bulbificación de *Lilium*

japonicum, atribuido a la secreción de exudados por el tejido de los microbulbos debido a la hidrólisis extracelular de la sacarosa endógena a glucosa y fructosa.

Los análisis para las variables altura de brotes (cm) y número de hojas/brotes en *A. sativum* revelaron diferencias significativas para todos los tratamientos evaluados a partir de los 60 días; mientras que para el número de brotes por microbulbo y regeneración de raíces no se detectaron diferencias a lo largo del experimento (datos no mostrados).

Para la variable altura de brotes (cm) la prueba de Kruskal Wallis conformó dos grupos a los 60 días (Cuadro 4). En el primero se ubicaron los

microbulbos cultivados en MS con sacarosa (T₁), con un valor máximo de 3,69 cm; mientras que en el segundo grupo se ubicaron los restantes tratamientos, destacándose los tratamientos 2 y 4 con valores entre 3,02 y 2,63 cm de altura, respectivamente. A partir de esta fecha los datos mostraron una tendencia similar, de esta forma, a los 210 días se conformaron tres grupos con un promedio máximo de 3,39 cm para el T₁ seguido por los tratamientos con ½ MS y ¼ MS, ambos con sacarosa (T₂ y T₄) con promedios de 2,89 y 2,70 cm de altura, respectivamente. Finalmente, los menores promedios se observaron en los tratamientos sin sacarosa (T₃ y T₅) con 2,39 y 2,33 cm, respectivamente.

Cuadro 4. Altura de brotes en *Allium sativum* cultivados en diferentes medios y tiempos de conservación

Tratamiento	Altura de brotes (cm)						
	días						
	30	60	90	120	150	180	210
MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	71,6	91,8 a	86,9 a	82,8 a	76,8 a	71,6 a	66,3 a
½ MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	69,2	47,5 b	60,8 ab	69,7 ab	67,9 ab	69,2 a	59,8 ab
½ MS	70,8	42,6 b	52,8 bc	40,8 c	43,9 bc	38,0 b	32,7 c
¼ MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	61,1	60,1 b	40,2 bc	47,1 bc	43,2 bc	39,0 b	35,5 bc
¼ MS	70,5	55,9 b	29,7 c	30,1 c	28,5 c	29,3 b	31,9 c
Kruskal-Wallis	1,34 ns	32,36*	44,20*	42,56 *	37,17*	37,9*	29,3*

Valores del rango con letras distintas son estadísticamente diferentes según comparación múltiple no paramétrica (P≤0,05)

En comparación con los restantes tratamientos, los microbulbos cultivados en el medio MS con sacarosa presentaron la máxima altura de los brotes a los 60 días (3,69 cm) mientras que en los tratamientos con ½ MS y ¼ MS, con sacarosa, el máximo promedio de altura se expresó a los 150 y 120 días, respectivamente (3,20 y 2,98). Aún cuando, bajo estas tres condiciones de almacenamiento las diferencias entre el máximo promedio observado y el promedio a los 210 días fueron similares: 0,30; 0,31 y 0,28 para T₁, T₂ y T₄, respectivamente, a los fines de la conservación *in vitro* lo recomendado es que los materiales mantengan tasas mínimas de crecimiento a lo largo del tiempo, como se evidencia en los medios T₂ y T₄.

Para el número de hojas/brotes la prueba de Kruskal Wallis conformó tres grupos durante todo el período evaluado, es decir desde los 60 hasta los 210 días (Cuadro 5). En el primer grupo destacaron los microbulbos cultivados en MS con sacarosa (T₁), con un valor promedio de 1,73 hojas por brote a los 60 días, manteniendo esta

tendencia con 1,91 a los 210 días. En un segundo grupo los tratamientos 2 y 4, destacándose el medio con ¼ MS con sacarosa (T₄) con un desarrollo gradual de hojas/brotes de 1,45 a los 60 días hasta 1,82 a los 210 días, es decir, con una diferencia de 0,37 entre ambas fechas. Similar al comportamiento observado para la altura, los brotes cultivados en ¼ MS con sacarosa (T₄) alcanzaron su máximo valor promedio para esta variable a los 180 días, mientras que en los medios con ½ MS y MS (T₂ y T₁) ambos con sacarosa a los 150 días, lo cual es un indicativo de que el medio T₄ permitiría el mantenimiento de los materiales bajo condiciones de crecimiento mínimo durante un mayor período de tiempo.

En relación a las variables relacionadas con el follaje, los resultados revelaron que los microbulbos cultivados en los medios ¼ MS (T₄) y ½ MS (T₂), ambos con sacarosa, presentaron sus máximos promedios de regeneración a los 60 días, así como para las variables altura y número de hojas a los 120 y 180 días, en el caso de T₄ y 150 días para T₂. Contrariamente, en el medio MS con

sacarosa, el máximo promedio de regeneración observado a los 120 días sugiere que este medio favorece altas tasas de crecimiento y/o desarrollo

de brotes de manera progresiva a lo largo del experimento, lo cual resulta indeseable a los fines de la conservación *in vitro*.

Cuadro 5. Número de hojas/brote en *Allium sativum* cultivados en diferentes medios y tiempos de conservación

Tratamiento	Número de hojas/brote						
	Días						
	30	60	90	120	150	180	210
MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	72,3	76,9 a	78,5 a	86,2 a	77,8 a	72,1 a	64,7 a
½ MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	70,1	58,5 ab	42,9 b	46,7 b	42,9 b	38,7 b	34,8 b
½ MS	63,0	37,5 b	49,0 b	52,4 b	47,1 b	38,3 b	33,5 b
¼ MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	71,6	65,6 ab	53,9 ab	46,4 b	53,8 ab	53,1 ab	44,9 ab
¼ MS	66,0	62,3 ab	44,8 b	39,3 b	37,9 b	38,6 b	39,8 b
Kruskal-Wallis	1,8 ns	22,86*	21,61*	32,10*	23,13*	22,02*	18,18*

Valores del rango con letras distintas son estadísticamente diferentes según comparación múltiple no paramétrica (P≤0,05)

Debido a que bajo condiciones *in vitro* las plantas no se comportan totalmente autotróficas, sólo la presencia de sacarosa permitió que los microbulbos asimilaran las sales y otras sustancias del medio nutritivo para utilizarlos en el metabolismo de carbohidratos y su transformación en biomasa. Similarmente, durante la conservación *in vitro* de bromelias de exuberante follaje como *Billbergia rosea* y *Vriesea splendens* (Pardo et al., 2008, 2010), se destacó la importancia de un balance apropiado de sacarosa y sales para mantener los materiales vegetales con tasas mínimas de crecimiento.

Con respecto al peso y diámetro ecuatorial, los microbulbos cultivados en el medio ¼ MS con sacarosa (T₄), mostraron promedios de 1,42 g y 1,5 cm, respectivamente, mientras que aquellos almacenados en ½ MS y MS, ambos con sacarosa (T₂ y T₁), promedios de peso de 1,20 y 1,15 g y 1 cm diámetro, respectivamente. Por su parte, los menores valores se presentaron en los tratamientos 3 y 5 con promedios de 0,69 y 0,58 para el peso y de 0,9 y 0,8 para diámetro. Probablemente, los microbulbos cultivados en presencia de sacarosa, utilizaron este carbohidrato para mantener sus reservas internas logrando permanecer por más tiempo en los medios nutritivos en comparación con aquellos cultivados sólo con sales.

Debido a que los bulbos de ajo constituyen órganos de reserva adaptados para un almacenamiento a largo plazo (Brewster, 2001; Block, 2009) se evidenció a lo largo del período

de almacenamiento, el efecto que sobre este tipo de estructura ejerce el balance sacarosa-sales. De acuerdo a estudios previos (Zee y Munekata, 1992; Malaurie, 2001; Pardo et al., 2010) se ha determinado que bajo condiciones heterotróficas propias del cultivo de tejidos la presencia de sacarosa es indispensable para preservar el balance carbohidratos-sales en los tejidos, así como para activar los mecanismos fisiológicos que permitan un adecuado abastecimiento y translocación de agua y nutrientes dentro de la vitroplanta, de lo contrario la pérdida de agua y turgencia en la célula provocará deshidratación de los tejidos y otros síntomas de estrés.

Cuadro 6. Peso (g) y diámetro ecuatorial (cm) de microbulbos de *Allium sativum* a 210 días de su cultivo en diferentes medios de conservación

Tratamiento	Peso (g)	Diámetro (cm)
MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	1,15 b	1,0 ab
½ MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	1,20 b	1,0 ab
½ MS	0,69 c	0,9 b
¼ MS + 45g·L ⁻¹ de sacarosa	1,42 a	1,5 a
¼ MS	0,58 c	0,8 b
CV (%)	25,8	19,7

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey (P≤0,05)

CONCLUSIONES

La conservación de microbulbos pudo realizarse en cinco tratamientos de conservación

in vitro, registrándose en el medio $\frac{1}{4}$ MS con $45\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa los mayores promedios para las variables sobrevivencia, vigor, peso y diámetro a los 210 días de evaluación. De esta manera, el almacenamiento bajo condiciones de crecimiento mínimo puede realizarse en este medio por un período de siete meses sin necesidad de realizar nuevos subcultivos, permitiendo utilizar el protocolo de conservación aquí descrito para preservar la biodiversidad así como para favorecer el intercambio internacional del germoplasma de *A. sativum* clon 'Boconó'.

AGRADECIMIENTO

A Paúl Azuaje Pardo por la colaboración prestada. Al CDCHT-UCLA por el financiamiento otorgado. Al personal del Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Decanato de Agronomía, UCLA.

LITERATURA CITADA

- Abdelali, M, A. Amri, M. Ajlouni, R. Assi, Y. Sbieh y A. Khnifes. 2008. Gender dimension in the conservation and sustainable use of agro-biodiversity in West Asia. The Journal of Socio-Economics 37: 365-383.
- Barrueto, L., Dieter, R. y Piedrabuena, A. 1994. Regeneration of garlic plant (*Allium sativum* L., cv. Chonan) via cell culture in liquid médium. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 30: 150 - 155.
- Block, E. 2009. Garlic and other Alliums: The lore and the science. Ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido. 474 p.
- Borges, M, B. Malaurie, S. Portales y D. Calzadillas. 2008. Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). Revista Colombiana de Biotecnología 10(2): 111-119.
- Borges, M, Y. Alarcón, B. Malaurie, J. Hernández y J. Silva. 2009. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (Dioscoreaceae). Revista Peruana de Biología 16(2): 203-208.
- Brewster, J. 2001. Las cebollas y otros Alliums. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Chen, X., J. Li, X. Xin, Z. Zhang, P. Xin y X. Lu. 2011. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. South African Journal of Botany. 77(2011): 397-403.
- Engelmann, F. 1998. *In vitro* conservation of horticultural genetic resources review of state of the art. Acta Hort. 495: 245- 249.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resource. International Agriculture Series (8): 8-20.
- Keller, E, A. Senula, S. Leunufna y M. Grübe. 2006. Slow growth storage and cryopreservation tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. International Journal of Refrigeration. 29: 411-417.
- Keller, E y A. Senula. 2012. Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). Methods in Molecular Biology 994: 353-368.
- Kim, H, H. Lee, K. Hwang, F. Engelmann. 2007. Cryopreservation of garlic germplasm collection using the droplet-vitrification techniques. CryoLetters 28: 471-482.
- Malaurie, B. 2001. Medium and long term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. Acta Hort. 560: 69-77.
- 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 16(1): 55-60.
- Páez, J y R. González. 2001. Conservación *in vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo condiciones de crecimiento mínimo. Revista Latinoamericana de la Papa. 12: 121-129.
- Pardo, A, C. Michelangeli, C. Ramis, N. Mogollón y C. Silva. 2008. Evaluación de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD, en brotes de *Billbergia rosea* Hortus Ex Beer, conservados *in vitro*. Bioagro 20(2): 97-104.
- Pardo, A., C. Da Costa, G. Alvarado y J. Lorbes. 2010. Conservación *in vitro* de *Vriesea splendens* var. Lindley (Bromeliaceae). Boletín de Investigaciones Biológicas 44(3): 317- 330.

18. Robledo, A. y H. Tovar. 2012. Biotechnological tools for garlic propagation and improvement. *In*: Agbo E. (ed). Innovation in Biotechnology. pp. 31-56. Shangai, China. 474 p.
19. Sudarmonowati, E. 2000. Cryopreservation of tropical plants: current research status in Indonesia. *In*: F. Engelmann y H. Takagi. (eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. pp. 291-296.
20. Yamagishi, M. 1998. Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *Scientia Hort.* 73: 239-247.
21. Yi, J., H. Kim, N. Ro, H. Ko, M. Yoon y J. Kang. 2010. Implementing cryopreservation of garlic collections using diverse source materials in droplet-vitrification procedure. *Cryobiology.* 61: 400-408.
22. Zee, F y M. Munekata. 1992. *In vitro* storage of pineapple (*Ananas* spp.) germplasm. *Hort Science* 27(1): 57-58.