PROPAGACION IN-VITRO DE MERISTEMOS DE Allium sativum L.

JOSE C. PACHECO MALDONADO
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Matemáticas y Ciencias Naturales. Escuela de Biología. Depto. Genética y Ecología.

1. INTRODUCCION

El ajo es una planta herbácea perenne y cultivada como anual. Su multiplicación se realiza por bulbillos y en muy raros casos por medio de semillas. Es una planta apomíctica y cosmopolita que se cultiva para el aprovechamiento de sus bulbos, los cuales son usados como condimentos, para la extracción de productos medicinales y además sus hojas pueden utilizarse como verdura.

El ajo posee olor y sabor característicos. La alfina es la sustancia responsable del olor. Esta hortaliza es rica en proteínas, calcio, ácido ascórbico, carbohidratos, tiamina, niacina, hierro y fósforo.

En Colombia el ajo se cultiva en las regiones frías, pero el mejor clima para su desarrollo es el templado, donde no quede expuesto a cambios bruscos de temperatura. Soporta temperaturas más bajas que la cebolla. Durante la formación del bulbo requiere temperaturas de 0 a 10°C.

El cultivo del ajo está distribuído en Colombia especialmente en las zonas frías de los

Departamentos de Boyacá, Cundinamarca y Tolima.

Los cultivadores de ajo obtienen con mucha frecuencia malas cosechas debido a los perjuicios que ocasionan las plagas y las enfermedades que afectan a estos cultivos.

Se ha observado en Colombia durante los últimos cinco años una disminución en la producción de los cultivos a causa de una alta incidencia de enfermedades, incrementada entre otras causas, por el uso de semilla de baja calidad sanitaria, con el agravante que no solamente afecta a las plantas en cultivo sino también a la semilla vegetativa en almacenamiento.

Los problemas patológicos de mayor incidencia en Colombia son: a) de carácter fungoso, causado especialmente por Fusarium oxisporum que puede producir hasta un 30% de pérdidas en los bulbos almacenados para semillas, y b) de carácter nematológico, causado especialmente por Dytilenchus dipsaci que produce aproximadamente un 23% de pérdidas en la producción.

Los patógenos se encuentran en los suelos de cultivo y son transportados por el viento, el agua, los cultivadores y por las herramientas de trabajo. Pero también se encuentran como parásitos endógenos dentro de los tejidos vegetales, los cuales se transmiten por la semilla vegetativa, en aquellas plantas que como el ajo no se propagan extensivamente por vía sexual. Los patógenos endógenos no pueden ser eliminados con prácticas de desinfección superficial de las semillas ya que los mismos tejidos los protegen.

Teniendo en cuenta que el cultivo del ajo es de alta rentabilidad, es necesario presentar una solución efectiva para que los cultivadores puedan disponer de semilla libre de patógenos la cual asegure en primera instancia una buena producción.

Una alternativa para la producción de semilla vegetativa en óptimas condiciones de sanidades la obtención in-vitro de plántulas de ajo minimizadas de patógenos las cuales puedan ser propagadas intensivamente en lugares con condiciones físicas controladas.

Las plántulas minimizadas de patógenos virales y completamente libres de hongos, bacterias y nemátodos pueden ser obtenidas por cultivo de meristemos.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales In-Vitro de la Escuela de Biología; en éste se establece una metodología eficiente para la obtención in-vitro de plántulas de ajo, con el objeto de contribuir a la solución de algunos de los problemas que afrontan nuestros agricultores productores de ajo para el consumo inmediato, así como en el mejoramiento de la producción con miras a la industrialización a mediano plazo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Mediante la utilización de la técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales in-vitro estandarizar un procedimiento para la obtención de plántulas minimizadas de patógenos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Estandarizar una secuencia técnica para la manipulación del material vegetal cultivado en condiciones in-vitro.

2.2.2. Determinar la composición química de un medio de cultivo in-vitro en el cual se puedan obtener plántulas de ajo a partir de yemas y de meristemos.

2.2.3. Determinar la clase y concentración de fitohormonas necesarias para regular el desarrollo de los explantes cultivados in-vitro.

☆★☆★☆

3. GENERALIDADES

Clasificación Taxonómica :

Reino :	Vegetal
División :	Angiospermas
Clase :	Liliopsida
Subclase :	Liliidae
Orden :	Liliales
Familia :	Liliáceas
Género :	Allium
Especie :	Allium sativum L.

Planta herbácea perenne, cultivada como anual. 2n = 16, multiplicada por bulbillos o por gajos del bulbo. Planta apomíctica y cosmopolita. Se cultiva para aprovechamiento de sus bulbos, usados como condimento y sus hojas pueden usarse como verdura.

Variedad : Allium sativum L. var. ophioscorodon (Link) Döll. Herbácea perenne. 2n = 16, 24, 32. Apomíctica cosmopolita cultivada por sus bulbos comestibles y usados como condimento, y por sus bulbillos que se consumen en encurtidos.

Sinónimos: A. controversum Schrad.
A. ophioscorodon Link.
A. scorodroprasum Lam.

El ajo es una planta bulbosa de la familia Liliáceas, originaria del Asia Central, conocida por los egipcios, griegos y romanos y cultivada en todos los huertos de todas las zo-

nas templadas y secas para beneficiarse de sus bulbos comestibles y productos aromatizantes y medicinales (eupépticos. desinfectantes intestinales). Su bulbo es prolífero y está compuesto por casi 10 bulbillos (dientes de ajo) oval-oblongos, rodeados por túnicas secas. Tiene escapo áfilo, cilíndrico, de hasta 70 cms. de altura; hojas lineares de sección cilíndrica, todas basales; flores blancas o rosadas en umbelas a menudo provistas de bulbillos; fruto en cápsula membranosa. Se conocen muchas especies de ajo: el acuático, llamado también junco florido, perteneciente a las butomáceas; el ajo blanco, con flores ornamentales blancas; el ajo de oso, rico en aceite etéreo, usado en medicina popular, que vive en los bosques frescos; el ajo pardo, cuyos bulbillos se usan como la escaluña y si se plantan en tierra, dan un bulbo azucarado y aromático parecido a la cebolla, que también pertenece al género Allium, (21).

Cuando las raíces no se originan en la radícula del embrión y ello sucede por ejemplo, en los bulbos de las Liliáceas en las que las numerosas raíces, casi todas iguales, parten de la base del bulbo, se llaman adventicias. Los bulbos son tallos subterráneos, formados por catáfilos, hojas en forma de escama desprovistas de clorofila, imbricadas o superpuestas. En el centro del bulbo se observa un tallo acortado con la yema apical. El crecimiento en longitud del tallo tiene lugar por medio de una yema apical que encierra al cono o ápice vegetativo constituído por tejido meristemático; inmediatamente debajo, se encuentran los primordios de las hojas en cuya axila se notan los esbozos de las yemas laterales; éstas mismas estructuras se observan en los bulbos, que consisten en una sola yema que encierra los primordios del tallo (escapo) prolífero. (22).

Los bulbos, en razón a la forma y disposición de sus catáfilos pueden ser de dos tipos; o bien se trata de la superposición de escamas carnosas o imbricadas, cada una de las cuales no reviste más que una pequeña superficie del bulbo: bulbo escamoso, o bien, los catáfilos son concéntricos en torno a un breve tallo y cada uno reviste una superficie notable: bulbo tunicado como en Allium, (22).

El ajo presenta tallo desprovisto de hojas: escapos afilos, cuyas hojas son fistulosas, o sea en tubo y todas basales, (22).

En Allium sativum puede presentarse apomixis vegetativa cuando en la inflorescencia se producen yemas vegetativas o bulbillos en lugar de flores, (9).

Los bulbos de ajo son tunicados, tienen escamas exteriores secas y membranosas. Esta cubierta o túnica, protege al bulbo contra las lesiones mecánicas y contra la desecación. Las escamas carnosas se encuentran en capas continuas y concéntricas (láminas) de modo que dan al bulbo una estructura más o menos sólida, (9).

Un bulbo individual pasa por un ciclo de desarrollo característico que comienza con su iniciación como un meristema y termina en su floración y producción de semillas. Este ciclo general de desarrollo está formado por dos fases fundamentales: (a) la fase vegetativa y (b) la fase reproductiva. En la fase vegetativa los bulbillos crecen hasta formar una estructura ideal para florecer alcanzando su peso máximo. La fase reproductiva subsecuente comprende la inducción de la floración (y a veces) la producción de semilla. Varias especies de bulbos tienen ex igencias ambientales específicas para las fases individuales de este ciclo, las cuales determinan su comportamiento estacional, su adaptación ambiental y sus métodos de manejo. Estas especies de bulbos pueden agruparse en clases, dependientes de su época de floración y método de manejo, (9).

Formación de bulbos: La fase vegetativa comienza con la iniciación del bulbillo sobre el platillo basal en la axila de una escama bulbar. En este período inicial que por lo general dura una sola estación de crecimiento, el bulbillo es relativamente insignificante, ya que se encuentra presente dentro de otro bulbo en crecimiento y sólo puede observarse haciendo la disección del bulbo, (9).

El tamaño del bulbo y la cantidad de reserva alimenticia determinan su valor comercial, aunque también son importantes otros factores como la condición del bulbo y la ausencia de enfermedades, (9).

En el cultivo de ajo raramente son empleadas las semillas, utilizándose en las siembras, los "dientes" o bulbillos exteriores de la cabeza, pues los interiores dan lugar a produc-

tos más pequeños, (6).

El ajo es una planta monocotiledónea. Es una planta pequeña de cerca de dos pies de alta, con hojas estrechas, alargadas y planas. Las hojas están asentadas en un disco inferior subterráneo del cual brotan las raíces. La parte inferior de la hoja es envolvente, superponiéndose unas a otras para formar el bulbo; cuando la planta tiene más de 7 hojas comienzan a formarse los dientes en las axilas de éstas, sobre el disco inferior; entonces la planta comienza a alargarse formando un tallo aéreo bien aparente. La formación y madurez de la cabeza culmina con la flacidez del cuello de la planta, doblándose casi a nivel del suelo, (14).

La cabeza del ajo es un bulbo tunicado, compuesto por varios bulbillos o dientes asentados en un disco inferior y separados entre sí por cubiertas individuales. El ajo generalmente no produce semillas, pero en lugar de éstas produce muchas veces pequeños bulbillos aéreos que pueden usarse para su reproducción, (14).

La enfermedad o pudrición de la raíz es frecuente en todas las plantaciones, puede ser transmitida por la semilla, por lo cual debe deshecharse todas las cabezas que hayan perdido las raíces o este manchada por la parte inferior y tenga las cubiertas descompuestas, (14).

Los cultivadores de cebolla y ajo obtienen con mucha frecuencia malas cosechas a causa del empobrecimiento de los suelos y como consecuencia de los perjuicios que ocasionan las plagas y enfermedades que afectan a estos cultivos. Los bulbos de ajo son afectados por numerosas afecciones fungosas, que ocasionan pudriciones o infestan a la nueva planta. Los bulbos que comúnmente se utilizan como semilla se encuentran infestados por hongos del género Fusarium y Cercóspora. (5).

El ajo es un cultivo de alta rentabilidad en Colombia; se cultiva en las regiones secas y frías del departamento de Boyacá, Cundinamarca, Nariño, Antioquia, Cauca, Tolima y Valle del Cauca. Se cultivan aproximadamente unas 1.000 hectáreas, las cuales no

abastecen las demandas del mercado interno, pues se carece de suficientes investigaciones acerca de las principales prácticas culturales para obtener una mayor producción. (8).

El nemátodo del tallo y del bulbo Ditylenchus dipsaci, se presenta especialmente en las zonas de Boyacá y Cundinamarca. Las plantas atacadas presentan un aspecto carnoso y descolorido de los bulbos; los nemátodos penetran a los dientes en formación causando daños severos, las puntas de las hojas se secan y se presentan doblamientos prematuros. Los bulbos atacados presentan escasez o ausencia de raíces y un olor azufrado característico, (11).

Las principales enfermedades que causan daño de importancia económica en ajo tienen como causa la presencia de microorganismos patógenos pertenecientes a hongos, bacterias y nemátodos, (13).

Hongos como Botrytis allii Munn., causan podredumbre del cuello de la planta; la pudrición de los bulbos puede ser causada por Penicillium corymbiferum y la podredumbre basal por Fusarium oxysporum Schlecht, mientras que el Sclerotium cepivorum Berk causa la podredumbre blanca que origina pérdidas hasta de un 30% en bulbos almacenados, (12).

Ditylenchus dipsaci, nemátodo del tallo, es un parásito de los bulbos, tallos y hojas, que pasa de una generación a otra dentro de los tejidos de los bulbillos que se utilizan para la propagación. Cuando las condiciones en la planta huésped no son favorables al parásito, éste emerge y penetra al suelo. Las larvas pueden sobrevivir en el suelo en condiciones desfavorables, en estado latente hasta por períodos de unos 5 años, (4).

Los nemátodos fitoparasitarios permanecen durante la mayor parte de su vida ya sea en el suelo o en partes de las plantas como raíces, tubérculos, yemas, bulbos y semillas. Habitan por lo general, la zona radical de las plantas y la mayor densidad de la población se halla muy cerca de las raíces. Los nemátodos fitoparasitarios son parásitos

obligados que se multiplican si tienen acceso a tejidos vegetales vivos como fuente alimenticia, (17).

En el caso de algunas enfermedades bacterianas, se cree que los nemátodos endoparasitarios al penetrar a la raíz, no hacen más que abrir las puertas de entrada a las bacterias. De algunas relaciones recíprocas nemátodo-hongo-planta, se sabe que el papel desempeñado por el nemátodo es de naturaleza más compleja que la mera vulneración de la planta. La infestación de los tejidos vegetales trae como consecuencia alteraciones fisiológicas del hospedante, (17).

Ditylenchus dipsaci es uno de los parásitos de plantas más cosmopolita: se encuentra en bulbos de ajo, cebolla, narciso y en raíces de fresa, alfalfa, trébol y otras plantas. Más de 400 especies de plantas pertenecientes a más de 40 familias, son atacadas en algún grado por este parásito. Su diseminación se realiza en primer lugar por el hombre, al transportar plantas o partes de ellas infestadas, por ejemplo bulbos; por medio de tierra contaminada y por agua de irrigación, (17).

El uso de semilla libre de nemátodos constituye un medio seguro y eficiente para controlar este parásito. Por el empleo imprudente de plantas o partes de las mismas que están contaminadas se transmiten a muchos campos nuevos especies de nemátodos que anteriormente no existían allí, lo que va dificultando el control. El daño máximo no se produce probablemente en las plantas transmisoras sino en aquellas que se cultivan en los años siguientes en el campo recién infestado . (15).

Algunos métodos físicos de control de Ditylenchus dipsaci utilizados parcialmente son: tratamiento de suelo con vapor, tratamiento de semillas y plantas con agua caliente, electricidad, radiación y ultrasonido. El control biológico está dado por hongos, protozoos y nemátodos predadores. Además de éstos también se hace regulación del tiempo de siembra y cosecha, remoción o destrucción de plantas hospederas infestadas, inundación, rotación de cultivos y utilización de plantas trampa. (18).

Los nemátodos invaden todos los tejidos parenquimatosos. Las larvas y los adultos de Ditylenchus dipsaci migran en el suelo hacia los hospederos susceptibles y penetran a éstos a través de los estomas de las hojas o heridas de los bulbos, (20).

Los nemátodos penetran a través de las aberturas naturales de los dientes y es probable que sólo sean capaces de producir una ligera lesión mecánica y que la mayor parte del daño se deba a los efectos de las secreciones por el estilete, principalmente por las enzimas pécticas que al ser inyectadas en los tejidos disuelven las laminillas medias lo que origina que en la vecindad de la región invadida se separen las células entre sí. En los tejidos de almacenamiento, estas células separadas se redondean lo que da a la estructura una apriencia blanquecina y una textura harinosa, (4).

La producción de plantas libres de enfermedades por la técnica de Cultivo de Tejidos ha tenido un gran desarrollo en los últimos tiempos y se ha llegado a un entendimiento entre los cultivadores de tejidos y los patólogos sobre las estrategias y tácticas requeridas, (19).

Los hongos que presentan algunos de los más severos problemas en cultivos hortícolas son aquellos que causan daños vasculares (especies de Fusarium, Verticillium y Phialophora). Las técnicas de cultivo de estacas son ámpliamente usadas en forma comercial para el mantenimiento de bloques madres libres de enfermedades, generalmente con resultados exitosos. La técnica está basada sobre el hecho que los patógenos no están presentes en las partes apicales de todos los brotes vegetativos de plantas infectadas, y a menudo, sólo en las partes bajas del sistema vascular. Similarmente bacterias patógenas tales como Erwinia chrysanthemi, Pseudomonas caryophulli y Xanthomonas pelargonii pueden ser eliminadas utilizando la técnica de esquejes. Sin embargo, debido a la distribución irregular de los patógenos en el sistema vascular es posible fallar en su detección en pruebas de cultivo y algunas plantas infectadas pueden permanecer sin ser detectadas, (1).

Muchas enfermedades causadas por micoplasmas y riketsias, pueden ser realmente eli-

minadas por cultivo de puntas de brotes. Estos patógenos están restringidos a elementos de xilema y floema, (7).

Todas las variedades de ajo (Allium sativum) comerciales están infectadas por virus. El virus del mosaico del ajo causa síntomas visibles y reduce la producción de dientes de 3 a 45%. Debido a que el ajo es sexualmente estéril y propagado estrictamente por dientes y bulbillos, el cultivo de callos y meristemos es un medio por el cual plantas libres de virus pueden ser obtenidas. Además la producción de plantas libres de virus, la variabilidad genética o la restauración de la fertilidad puede ocurrir en plantas diferenciadas de callos, (2).

Después del éxito de Morel en 1965 en la multiplicación de orquídeas por cultivo de meristemos, ha habido un interés creciente en la aplicación de la técnica de Cultivo de Tejidos como un medio alternativo de propagación asexual, de plantas importantes económicamente. El cultivo de puntas meristemáticas y el cultivo de yemas son preferidos por sobre el cultivo de meristemos en micropropagación, cuando la eliminación viral no es el objetivo. El uso de explantes más grandes es deseable por su facilidad en la disección y por tener ratas más grandes de sobrevivencia y crecimiento. Las técnicas de propagación in–vitro son, ahora, a menudo preferidas a las prácticas convencionales de propagación asexual en muchas especies, debido a las siguientes ventajas potenciales: (a) sólamente una pequeña cantidad de tejido vegetal es necesaria como explante inicial para la regeneración de millones de plantas clonales en un año. En comparación, ésto puede tomar años para propagar un número igual de plantas por métodos convencionales. (b) muchas especies de plantas son altamente resistentes o recalcitrantes a las prácticas convencionales de propropagación masiva. La micropropagación in-vitro suministra un método alternativo posible para estas especies. (c) La técnica in-vitro suministra un método para el intercambio internacional, muy rápido, de material vegetal. Si es manipulado apropiadamente el estado de esterilidad del cultivo elimina el peligro de introducción de enfermedades. Así el período de cuarentena es reducido o no necesario. (d). los stocks in-vitro pueden ser proliferados rápidamente en cualquier tiempo del año, mientras que la propagación por métodos convencionales es altamente dependiente de las estaciones, (3), (10).

Existen tres rutas posibles disponibles para la multiplicación de propágulos in-vitro: (a) ayudando al desarrollo de yemas axilares; (b) produciendo brotes adventicios a través de organogénesis; (c) induciendo embriogénesis somática. Cada uno de los métodos de propagación tiene sus propios méritos y obstáculos, (16).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. MATERIALES :

4.1.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fue bulbillos de ajo, Allium sativm L. almacenados por 80 días a temperatura promedio de 13°C y con buena aireación. Al cabo del período de almacenamiento los bulbillos han alcanzado su madurez y presentan internamente una yema central bien desarrollada, que alcanza una longitud igual a la del bulbillo.

4.1.2. MEDIO DE CULTIVO

El medio básico para el cultivo in-vitro de yemas y meristemos fue el MS (Murashige and Skoog. 1962) suplementado con compuestos orgánicos tal como se muestra a continuación:

COMPUESTO	*CANTIDAD*
NH_4NO_3	1.650 mg/l
KNO_3	1.900 mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_20$	370 mg/l
KH_2PO_4	170 mg/l
EDTA-férrico	40 mg/l
Sucrosa	30 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ s.s.	2.9 ml/l
Micronutrientes MS s.s.	1.0 ml/l
KI s.s.	1.0 ml/l
Vitaminas s.s.	1.0 ml/l
Agar	0.6%
pH	5.8

Las soluciones stock (s.s.) se preparan de la siguiente manera, y se mantienen a 4°C:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$: se disuelven 15 gramos de cloruro de calcio en 100 mililitros de agua.

Micronutrientes MS :

COMPUESTO	*CANTIDAD*
H_3BO_3	620
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.230
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	860
$Na_2MoO_2 \cdot 2H_2O$	25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2.5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2.5

Los compuestos son disueltos en 100 ml de agua.

KI : se disuelven 75 mg de KI en 100 ml de agua.

Vitaminas :

COMPUESTO	*CANTIDAD EN mg/100 ml*
Acido nicotínico	100
Tiamina HCl	1.000
Pyridoxina HCl	100
Myo-inositol	10.000

Los compuestos son disueltos en 100 ml de agua.

El pH se ajustó con KOH 0,5N.

El agua utilizada para la preparación de las soluciones stock y para el medio de cultivo es destilada y esterilizada.

Todos los componentes del medio de cultivo se mezclan en un recipiente y se ajusta el volumen a 1000 ml con agua. Se calienta hasta ebullición y luego se adicionan las fito-

hormonas correspondientes a cada tratamiento. Finalmente el medio es envasado en tubos de ensayo de 50 ml con alicuotas de 10 ml cada uno, se tapan con papel de aluminio y se esterilizan a 15 p.s.i. por 15 minutos. Este protocolo se siguió en todos los casos.

Las fitohormonas utilizadas fueron:

AIA : Acido 3-indol-acético.

ANA : Acido Naftil-acético.

Kin. Kinetina : 6-furfuril-aminopurina.

4.2 PROCEDIMIENTO

4.2.1 DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL

Las cabezas de ajo se desgranan manualmente para obtener los bulbillos o dientes a los cuales se les retiran las membranas que los recubren; se acumulan en un recipiente de vidrio en el cual se esterilizan utilizando etanol al 96% por un minuto e hipoclorito de calcio al 4% por 15 minutos; se deshecha el hipoclorito y los bulbillos se lavan por 4 veces consecutivas; esta última operación y todas las posteriores se realizan en la cámara de flujo laminar.

4.2.2. SIEMBRA

4.2.2.1. Siembra de Yemas: Con ayuda de bisturí, pinzas, agujas de disección y estereomicroscopio se disectan las yemas completas haciendo una insición longitudinal al bulbillo. Del disco de cada yema se cortan las raíces, haciendo un raspado. Cada yema se coloca en un tubo con medio de cultivo y se incuba a 25 ± 1°C, con fotoperíodo de 16 horas.

4.2.2.2. Siembra de Meristemos:

Se realizan los mismos pasos del procedimiento anterior hasta la obtención de la yema y se hace una segunda esterilización por 5 minutos; luego se hace la disección del meristemo que se encuentra en la parte basal y central de la yema, en el ápice de un pequeño tallo que sale del disco; se disecta un meristemo por cada yema; estos meristemos están

acompañados por 2 a 4 primordios. El explante así obtenido tiene entre 0.5 y 0.8 mm de longitud. Los explantes son colocados individualmente en los tubos con medio de cultivo de tal manera que la superficie de corte quede haciendo contacto con la superficie del medio. Los tubos se incuban a 25 ± 1°C, con fotoperíodo de 16 horas.

4.2.3. ENRAIZAMIENTO

Las "plántulas" (sin raíz) se transplantan al mismo medio de inducción de crecimiento para meristemos con las siguientes concentraciones de hormonas:

TRATAMIENTO	*HORMONA*	*CONCENTRACION (en mg/l)*
1	ANA	1.0
2	ANA	0.9
3	ANA	0.8
4	ANA	0.7
5	AIA	1.0
6	AIA	0.9
7	AIA	0.8
8	AIA	0.7

y se incuban a 25 ± 1°C y fotoperíodo de 16 horas.

4.2.4. HABITUACION

Las plántulas enraizadas fueron transplantadas a recipientes individuales y cubiertas con bolsas de polietileno. El sustrato utilizado fue arena esterilizada humedecida con solución nutritiva.

TRATAMIENTO PARA CULTIVO IN-VITRO DE YEMAS Y MERISTEMOS DE AJO

MEDIO TRAT/		*FITOHORMONAS*	*CONCENTRACION* (mg/l)	*No. DE REPETICIONES*
MS	1	ANA	0.4	20
	2		0.5	20
	3		0.6	20
	4	AIA	0.4	20
	5		0.5	20
	6		0.6	20
	7	KIN	0.4	20
	8		0.5	20
	9		0.6	20
	10	ANA + KIN	0.2 + 0.5	20
	11	ANA + KIN	0.4 + 0.5	20
	12	AIA + KIN	0.2 + 0.5	20
	13	AIA + KIN	0.4 + 0.5	20
	14 *	SIN HORMONAS		100

* Tratamiento para yemas completas.

ANA = Acido Naftil-acético

AIA = Acido 3-indol-acético

KIN = Kinetina = 6-furfuril-aminopurina.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 MATERIAL VEGETAL

En todas las experiencias se utilizaron bulbillos de ajo sin ninguna selección previa, lo que implicó el uso de material contaminado e infestado que en muchos casos presentaba lesiones en el catáfilo externo tal como se observa en la fotografía No. 1. Al disectar la yema puede apreciarse en ella una aparente sanidad como se observa en la fotografía No. 2.

El tiempo de maduración de los bulbillos, de 80 días, a una temperatura promedio de de 13°C y con buena aireación son condiciones apropiadas para la obtención de yemas con desarrollo inducido, fotografía No. 3. Sin embargo es posible reducir el tiempo de maduración si los bulbillos se colocan a temperaturas entre 7 y 10°C. Para el cultivo in-vitro no resulta crítico el tiempo de maduración, sólo es necesario que en el momento de la disección el desarrollo de la yema haya sido inducido; dicha inducción refleja la ausencia de inhibidores de germinación.

5.2 MEDIO DE CULTIVO

El medio básico utilizado, el MS, suplementado tal como se indica en el numeral 4.1.2. es un medio óptimo tanto para el desarrollo de yemas como para cultivo de meristemos. La concentración de agar, 0.6% es óptima para el desarrollo radicular ya que las raíces penetran al medio fácilmente y además al retirar las plántulas enraizadas, el sistema radicular sale libre de agar evitando su lavado antes de transplantar a materas. El pH no resulta crítico pues se puede trabajar en un rango relativamente amplio: 5.6 - 6.0; igual

ocurre con la sucrosa la cual se puede adicionar en cantidades entre 20 y 30 g/1 sin que su efecto sea significativo.

Las hormonas con que se suplementó el medio no son las únicas que pueden ser utilizadas. Existe una gran variedad de auxinas y citoquininas sintéticas que podrían ser probadas sobre todo para cultivo de meristemos.

5.3. DESINFECCION DEL MATERIAL VEGETAL

La desinfección del material vegetal puede realizarse teniendo en cuenta como variables la concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección, teniendo como norma general que a mayor concentración, menor tiempo y viceversa. Se puede también tener en cuenta que esta desinfección es superficial y que por lo tanto sólo elimina contaminación en tal sentido dejando intactos los contaminantes endógenos. La desinfección de bulbillos con: alcohol al 96% por un minuto + hipoclorito de calcio al 4% por 15 minutos no es efectiva para la siembra de yemas tal como se pudo comprobar en el tratamiento 14, tabla 1, con un 83% de contaminación por hongos. Este resultado demuestra que aunque la yema central aparentemente es aséptica, el disco basal permanece con agentes patógenos que se desarrollan inmediatamente después que son puestos en cultivo. Esta contaminación se puede reducir de dos maneras: aumentando la concentración del desinfectante y/o aumentando el tiempo de desinfección, o mejor aún realizando una segunda esterilización de las yemas ya disectadas del bulbillo, con la misma solución desinfectante por un tiempo de 5 minutos. En cualquier caso es necesario tener en cuenta que a mayor drasticidad en los procedimientos de desinfección se produce una menor viabilidad del explante. Aún disminuyendo el porcentaje de contaminación, en el caso de las yemas, con la desinfección superficial no podrá asegurarse una eliminación de patógenos en un 100%. En el caso del material utilizado para la disección de meristemos la desinfección puede ser drástica teniendo en cuenta que el explante para el cultivo (el meristemo) está bien protegido por los catáfilos que conforman el bulbillo; para este caso la contaminación que apareció en los tratamientos 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12 y 13, Tabla 1, se debe a la presencia de patógenos que no están en el explante a cultivar. Esta

Foto Nº 1

Foto Nº 2

Foto Nº 3

Foto Nº 4

afirmación es válida teniendo en cuenta que la contaminación aparece sobre la superficie del medio y no sobre el explante. El 100% de la contaminación en los tratamientos en que se presenta se produce por agentes fungosos lo que indica que los agentes bacteriales son bien eliminados por los agentes desinfectantes utilizados.

Aunque la eliminación total de la contaminación sería ideal, en nuestro caso no es el objetivo perseguido ya que se trata de obtener un determinado número de plántulas asépticas para luego ser clonadas bajo condiciones controladas.

5.4. SIEMBRA DE YEMAS

Las yemas con desarrollo inducido se pueden cultivar en el medio propuesto sin hormonas con un éxito del 100% sin hormonas, tratamiento 14, tabla 1, en lo que se refiere a morfogénesis de sistema aéreo y radicular, fotografías No. 4 y 5. Sin embargo la presencia de patógenos endógenos especialmente en el disco se convierte en una limitante para su uso extensivo. Su uso resulta ventajoso porque se asegura la recuperación de plántulas completas en un tiempo muy corto, 7 días, en un estado de desarrollo adecuado para transplantar a maceta.

5.5. Siendo los meristemos estructuras minimizadas de patógenos, su cultivo y recuperación de plántulas da como resultado la obtención de material vegetal en óptimas condiciones fitosanitarias. La viabilidad de los meristemos de ajo es, en todos los tratamientos, alta según el resultado "% de desarrollo de la parte aérea" tabla 1, entre 60 y 100%. La pérdida de explantes se debe a defectos en la manipulación del material vegetal, teniendo en cuenta que la disección del meristemo requiere del operario excelentes habilidades y destrezas en el manejo del equipo para que el explante obtenido no sufra lesiones.

Los tratamientos con auxinas, ANA y AIA, 1 a 6, tabla 1, dan resultados semejantes a aquellos con la citoquinina kinetina, 7, 8 y 9, tabla 1, siendo el tratamiento 6 el óptimo para el desarrollo de la parte aérea, fotografía No. 6.

El uso de combinaciones ANA + KIN y AIA + KIN también dan como resultado desarrollo del sistema aéreo, tratamientos 10, 11, 12 y 13, tabla 1, pero los porcentajes en ninguno de ellos alcanza al óptimo del tratamiento 6.

La inducción y/o desarrollo del sistema radicular, tabla 1, se presenta en todos los tratamientos, siendo los porcentajes más altos en 4 y 5 con 55 y 60% respectivamente. Aunque estos porcentajes son relativamente bajos constituyen el mejor resultado de este trabajo ya que esta inducción radicular se presenta en el mismo medio en el que se siembran inicialmente los meristemos, venciéndose así el "cuello de botella" que representa el enraizamiento en propagación in-vitro.

La recuperación de "plántulas completas normales" tabla 1, en mayor porcentaje y con un solo tratamiento se presenta en los tratamientos 4 y 5 en concordancia con el aspecto "inducción y/o desarrollo del sistema radicular" lo que implica que todos los meristemos en los que se induce el sistema radicular también se produce desarrollo de la parte aérea, fotografías No. 7 y 8.

La "formación de callo" tabla 1, se presenta en los tratamientos 1, 4, 6, 10 y 13, y se debe muy posiblemente a factores genéticos de los tejidos más que a factores del medio de cultivo. Los porcentajes son relativamente bajos y no constituyen una condición limitante en el cultivo de meristemos de ajo. Además resalta el hecho que a pesar de utilizar rangos de concentraciones hormonales relativamente altos, los explantes muestran estabilidad morfogenética.

Las "malformaciones foliares" tabla 1, se presentan como engrosamiento y acortamiento de hojas, en porcentajes relativamente bajos a excepción del tratamiento 12, 45%. Al igual que en el aspecto inmediatamente anterior los factores genéticos de cada explante parecen ser los responsables de estas anomalías.

En los tratamientos 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 Tabla 1 se observó un obscurecimiento de la superficie del explante que queda en contacto con el medio de cultivo, un me-

Foto Nº 5

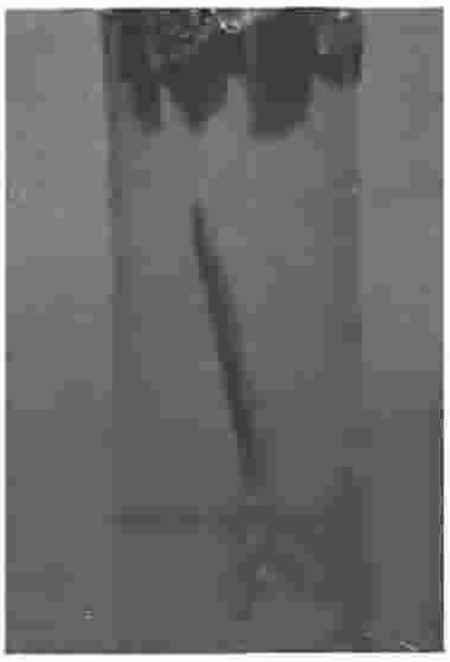

Foto Nº 6

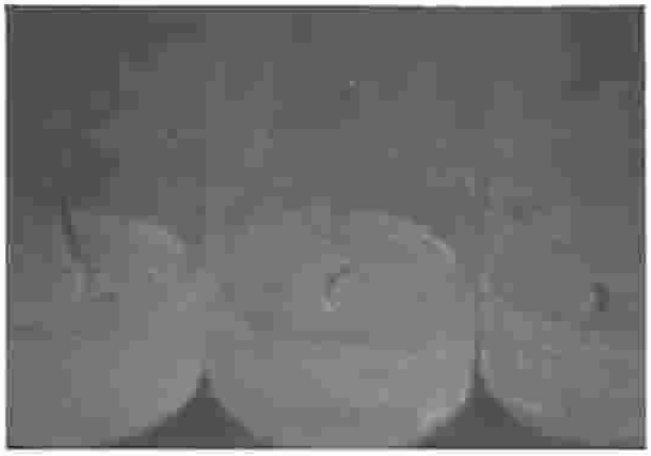

Foto Nº 7

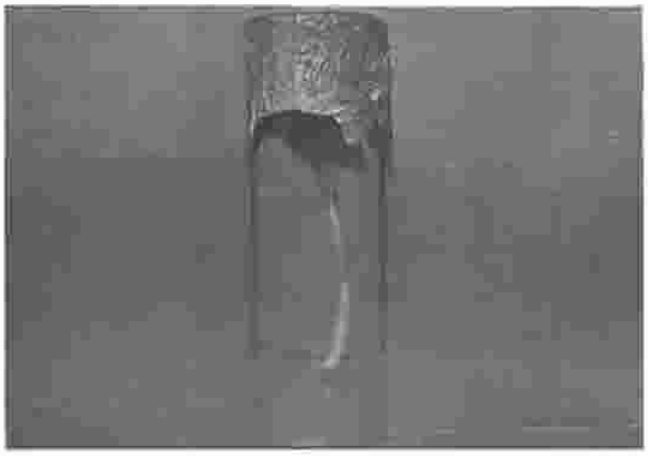

Foto Nº 8

nor desarrollo de la parte aérea y una reducción en el número de raíces, máximo 4, más gruesas y de posición horizontal. Estos efectos se deben a la presencia de la kinetina ya que no se observan en los tratamientos 1 a 6.

El desarrollo más vigoroso de plántulas completas se presentó en los tratamientos 4 y 5 tal como se observa en la fotografía No. 8.

5.6. ENRAIZAMIENTO

En la tabla 2 se muestran los resultados de los tratamientos para inducir enraizamiento siendo el de más alto porcentaje el 4 con 71%. Nuevamente, si se tiene en cuenta que el objetivo es limpiar una determinada cantidad de material vegetal, el rendimiento de este tratamiento es aceptable. Este resultado es superior al obtenido en el tratamiento 3, tabla 1, con 0.6 mg/l de ANA (15% de enraizamiento) lo cual sugiere una siembra inicial con 0.7 de ANA, con miras a elevar el porcentaje de enraizamiento con un solo tratamiento.

5.7. HABITUACION

La recuperación de plántulas sacadas del tubo de ensayo es exitosa en 100%, si se realiza en forma progresiva y lenta. Esto se logra perforando gradualmente la bolsa de polietileno con la que se cubre inicialmente la maceta. En esta etapa es necesario mantener una humedad relativa alta dentro de la bolsa para evitar deshidratación. La condición inicial de esterilidad del sustrato es necesaria mientras las plántulas adquieren sus propios mecanismos de defensa.

TABLA 2. RESULTADOS DE PRUEBAS DE ENRAIZAMIENTO DE "PLANTAS DE AJO"

TRATAMIENTO	*HORMONAS*	*CONCENTRACION (mg/1)*	*PORCENTAJE DE ENRAIZAMIENTO*
1	ANA	1.0	41
2	ANA	0.9	41
3	ANA	0.8	55
4	ANA	0.7	71
5	AIA	1.0	27
6	AIA	0.9	9
7.	AIA	0.8	41
8.	AIA	0.7	29

6. CONCLUSIONES

6.1: Mediante la técnica de cultivo in-vitro es posible recuperar plántulas de ajo libres de bacterias, hongos y nemátodos patógenos, utilizando como explante inicial los meristemos de las yemas de los bulbillos.

6.2. El proceso para la recuperación de plántulas desde el momento de la siembra del meristemo hasta la habituación en maceta es bastante rápido, aproximadamente 20 días.

6.3. El medio de cultivo propuesto, suplementado con AIA, 0.4 - 0.5 mg/l es óptimo para el cultivo de meristemos de ajo, teniendo la gran ventaja que en un solo medio se induce la morfogénesis completa de la planta.

6.4. Las condiciones físicas para el cultivo in-vitro: temperatura 25 ± 1°C y fotoperíodo de 16 horas son óptimas para el desarrollo morfogenético de meristemos a plántula.

6.5. El procedimiento establecido se presenta como una alternativa efectiva para la obtención de semilla vegetativa de ajo en óptimas condiciones fitosanitarias.

6.6. La multiplicación intensiva del material obtenido in-vitro sería de gran ayuda para los agricultores, máxime si se tiene en cuenta que actualmente no existe en el mercado semilla certificada, lo que implica para ellos tener que utilizar para sus cultivos bulbillos con diferente grado de contaminación e infestación que repercuten directamente en la producción.

7. BIBLIOGRAFIA

1. ABBOT, A. J. Propagating temperatura woody species in tissue culture. Sci. Hort., 28: 155-162. 1977.

2. ABO EL-NIL, M. Organogenesis and embriogenesis in callus cultures of garlic (Allium sativum L.). Plant Sci, Lett., 9:259-264. 1977.

3. BOXUS, Ph. et. al. Large scale propagation of strawberry plant from tissue culture. In: Aplied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Ed. J. Reinert and Y. Bajaj. pp. 130-143. Springer-Verlang, Berlín, Heidelberg, New York, 1977.

4. CHRISTIE, J. R. Nemátodos de los vegetales. Su ecología y control. 1a. Ed. México, 275 p. 1977.

5. COLINAGRO, LTDA. El cultivo de la cebolla y el ajo. Revista Nacional de Agricultura No. 594 pp. 23-24, octubre 1954.

6. DE ERGUIRAUN, J. Cultivo lucrativo: el ajo. La Hacienda. pp. 66-78, agosto 1969.

7. DIMOCK, A. W. Obtaining patogen-free stock by cultured cutting techniques. Phytopathology, 52: 1239-1241, 1962.

8. ESPITIA, J.S. y HERNANDEZ, B.P. Sintomatología de la deficiencia de los elementos nutritivos esenciales en el ajo. Tesis de grado UPTC. Tunja. 146 p. 1986.

9. HARTMANN, T. H. y KESTER, D.E. Propagación de plantas principios y prácticas. Ed. C.E.C.S.A. 814 p. 1975.

10. HUANG, S-C. and MILLIKAN, D. Production of apple plantlets by tipo meristem culture. Trans. Mo.Acad. Sci. 10, 11: 279 (abstract). 1977.

11. JARAMILLO, V. J. Hortalizas. Manual de asistencia Técnica, No. 28. pp. 1-15; 275-278, 1983.

12. LEGUIZAMON, J. y BARRIGA, O. R. Ajo. Hortalizas y frutales. Resumen de tesis para optar el título de Msc. ICA. U.N. Bogotá. 1971.

13. MEDRANO, C. et. al. Cebolla y ajo. Serie A. No. 39. Fundación Servicio para el agricultor. pp. 93, 1975.

14. OLIVE, A. Cultivo del ajo. Agrotecnia, septiembre-octubre de 1957. pp:34-39.

15. PEÑA, V. H. y NORATO, F.T. Comparación de dosis y épocas de aplicación de tres productos químicos para el control de Ditylenchus dipsaci, en el cultivo del ajo. Tesis de grado, UPTC, Tunja, 66p. 1974.

16. ROEST, S. and BOKELMAN, G. Vegetative propagation of carnation in-vitro through multiple shoot development. Sci. Hort., 14:357-366. 1981.

17. SASSER, J. N. Introducción a los problemas del ataque de nemátodos en las plantas cultivadas universalmente. Sinopsis sobre los métodos de control. Z. Pflanz. Nachr. (Germany), pp 3-51, 1971.

18. SOLER, R. G. y DIAZ, G.F. Control químico del nemátodo Ditylenchus dipsaci K. en el cultivo del ajo. Tesis de grado, UPTC, Tunja, 59 p. 1973.

19. STONE, O. M. The production and propagation of disease free plants. Propagation of higher plants throgh tissue culture. Ed. by, Hughes, K., Henke, R. and Constantin, M. Proceedings of an International Symposium Held at the University of Tennessee, April 16-19, 1978. pp 25-34.

20. THORNE, G. Principles of nematology. Ed. McGraw-Hill. New York, pp 95-240, 1961.

21. TOSCO, U. Diccionario de Botánica. Ed. Teide, S.A. Barcelona. 256 p. 1973.

22. _____, _____. Atlas de Botánica. Ed. Teide, S.A. Barcelona 246 p. 1973.

☆★☆★☆★☆