

## Evaluación de condiciones de almacenamiento y crecimiento de microbulbos de ajo provenientes de cultivo *in vitro*

### Evaluation of storage conditions and growth in greenhouse of microbulbs of garlic from tissue culture

Adriana A. Pardo Roldán<sup>1\*</sup>, Gregorio A. Cabrera Osechas<sup>1</sup> y Nancy J. Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Decanato de Agronomía. Unidad de Biotecnología Vegetal. \*Correos electrónicos: apardo@ucla.edu.ve, pardoadriana@yahoo.es

#### RESUMEN

El desarrollo de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.) producidos en laboratorio y su adaptación a condiciones de casas de cultivo, puede ser considerado un paso previo para los programas de mejoramiento, ya que garantiza la producción masiva de clones libres de plagas y enfermedades. A tal fin, se establecieron ensayos de laboratorio y almacenamiento en casas de cultivo de ajo clon 'Boconó'. Durante el almacenamiento, los bulbos fueron separados por tamaño y sometidos a tres temperaturas (4, 10 y 23 °C) y dos condiciones lumínicas (iluminación-oscuridad) durante 45 días para posteriormente ser sometidos a condiciones de cámara húmeda usando Promix® como sustrato. Los microbulbos procedentes de la etapa anterior, fueron transferidos a canteros fijos en la casa de cultivo del INIA (Cubiro, estado Lara). Se analizaron datos por estadística paramétrica y no paramétrica. La microbulbificación ocurrió a partir de brotes cultivados en Murashige y Skoog con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2ip y 90 mg L<sup>-1</sup> de sacarosa. Independientemente de las condiciones lumínicas, las temperaturas de almacenamiento de 4 y 10 °C favorecieron la emisión de grelo y los mayores promedios para diámetro y peso de microbulbos. Los microbulbos almacenados a 4 y 10 °C respondieron favorablemente al trasplante a condiciones de cámara húmeda, registrando los mayores promedios para las variables altura de plantas y número de hojas. En casas de cultivo, los materiales almacenados a 10 °C presentaron los mayores promedios para las variables del follaje y bulbo. Estos resultados pueden contribuir a la producción de semilla básica de ajo y su incorporación a programas de mejoramiento.

**Palabras claves:** *Allium sativum* L., bulbificación, mejoramiento genético, semilla básica.

#### ABSTRACT

Microbulbs development of garlic (*Allium sativum* L.) produced in the laboratory and its adaptation to conditions of growing houses, can be considered a prerequisite for breeding programs because it ensures mass production of clones free of pests and diseases. For such purpose, laboratory, storage and growing house tests were established with 'Boconó' garlic. During storage phase, bulbs were separated by size, and were subjected to three temperatures (4 °C, 10 °C and 23 °C) and two light conditions (illumination and darkness) for 45 days. Subsequently, microbulbs were grown in humid chamber using Promix® as substrate. Microbulbs from the previous stage, were transferred to fixed beds in the growing house at INIA (Cubiro, Lara state). Data were analyzed by parametric and non-parametric statistics. Microbulbification occurred from shoots grown in Murashige and Skoog with 2 mg L<sup>-1</sup> 2ip and 90 mg.L<sup>-1</sup> of sucrose. Regardless of lighting conditions, storage temperatures of 4 and 10 °C, favored the issuance of sprouts and the highest averages for microbulb diameter and weight. Microbulbs stored at 4 and 10 °C responded favorably to transplant to humid chamber conditions, recording the highest averages for the variables plant height and number of leaves. In the growing houses, materials stored at 10 °C showed the highest averages for both foliage and bulb variables. These results can contribute to the production of basic seed of garlic and their incorporation into breeding programs.

**Key words:** *Allium sativum* L., bulbification, breeding plant, basic seed.

Recibido: 30/04/14

## INTRODUCCIÓN

Investigaciones previas consideran que factores como competencia por nutrientes, que se requiere para el desarrollo simultáneo de bulbos e inflorescencias; el aborto de óvulos de plantas fértiles; condiciones ambientales adversas; presencia de enfermedades sistémicas en el cultivo y mutaciones deletéreas (Brewster, 2001; Mathew *et al.*, 2011), entre otras; han propiciado que la mayoría de los cultivares de ajo sembrados en la actualidad sean estériles, y por ende, carentes de semilla botánica. Debido a esto, los agricultores hacen uso para la siembra, de propágulos (dientes) de cosechas anteriores, generalmente de procedencia desconocida, contribuyendo a la diseminación de enfermedades, a una baja tasa de multiplicación de la especie y a la reducción de los rendimientos netos en las principales zonas hortícolas.

Específicamente en Venezuela, el cultivo del ajo es sembrado, cada año, por un menor número de agricultores, en áreas o parcelas cada vez más reducidas, lo cual ha traído como consecuencia que una gran cantidad de este rubro sea importado, lo que genera una considerable fuga de divisas.

Para solventar esta problemática se deben desarrollar programas de mejoramiento genético con énfasis en la calidad y producción masiva de bulbos, dientes o “semillas” que permitan cubrir la demanda, así como los requerimientos por parte de agricultores y consumidores.

Al respecto, el desarrollo de microbulbos, mediante el cultivo de tejidos y su posterior adaptación a condiciones de vivero, garantiza la propagación masiva de clones de ajo libres de plagas y enfermedades, y su posterior incorporación en programas de producción de semillas certificadas para la siembra.

Se ha reportado el éxito de la bulbificación *in vitro* del ajo siguiendo dos etapas: 1) Iniciación de brotes a partir de ápices caulinares (Bhojwani, 1980; Moriconi *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 2003; Luciani *et al.*, 2006) y; 2) Bulbificación en medios nutritivos como el de Murashige y Skoog (1962), en presencia de 2-isopentilamina (2ip), como regulador y de la sacarosa, como fuente de carbohidrato (Nagakubo *et al.*, 1993; Mujica y Mogollón, 2004; Mujica *et al.*, 2008).

Con relación al traslado a condiciones de vivero o casas de cultivo, diversos autores señalan que para el almacenamiento de los microbulbos se deben considerar factores como: temperatura, iluminación y tiempo de almacenamiento (James *et al.*, 2009; Ahn *et al.*, 2012; Palmero *et al.*, 2013), para favorecer la ruptura o periodo de latencia (Vázquez *et al.*, 2006), a los fines de facilitar una mayor sobrevivencia en campo (Burba *et al.*, 2007; Burba, 2009).

Por lo anteriormente señalado, se planteó como objetivo evaluar el desarrollo de microbulbos del clon ‘Boconó’ de *A. sativum* provenientes de cultivo *in vitro* bajo condiciones de casas de cultivo, con el propósito de obtener semilla básica y dar inicio a programas de mejoramiento genético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA) en Tarabana, estado Lara. Asimismo, la evaluación de campo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA); Campo Experimental Las Cuibas, localidad de Cubiro, estado Lara, Venezuela.

Al inicio se colectaron bulbos de ajo (*Allium sativum* L.), tipo morado, de zonas hortícolas en Boconó, estado Trujillo, sobre los cuales se realizaron experimentos de laboratorio, almacenamiento y casas de cultivo descritos a continuación:

### Experimentos en laboratorio

**Iniciación de brotes:** Se utilizaron brotes provenientes del cultivo de ápices caulinares, con una altura de 3 a 4 cm y de 3 a 4 hojas/brotes. Se siguió el protocolo establecido por Bhojwani (1980) y Zheng *et al.* (2003), utilizándose para ello el medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), constituido por sus sales inorgánicas en concentraciones completas, 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, vitaminas: tiamina-HCl (30 mg L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (10 mg L<sup>-1</sup>), piridoxina (1 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2 mg L<sup>-1</sup>) y mioinositol (100 mg L<sup>-1</sup>).

Los reguladores de crecimiento empleados fueron ácido naftalenacético (ANA) a una concentración de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  en combinación con 2-isopentilamina (2ip) a una concentración de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . El medio se dispensó en tubos de ensayo de  $25 \times 150 \text{ mm}$ , distribuidos con alícuotas de  $20 \text{ ml}$  por cada tubo, colocándose un ápice por tubo de ensayo. Los explantes de  $4 \text{ mm}$  de longitud cultivados en tubos de ensayos fueron ubicados en cuartos de crecimiento a una temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , iluminación de  $13,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  y fotoperíodo de  $16 \text{ h}$  durante  $30 \text{ días}$ .

**Microbulbificación:** Se emplearon brotes con una altura entre  $3$  a  $4 \text{ cm}$ , regenerados en condiciones *in vitro*, a los cuales se les eliminaron las raíces y el follaje dejando una pequeña sección de tallo. Los mismos fueron cultivados en medio MS con  $90 \text{ mg L}^{-1}$  de sacarosa y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de 2ip (Mujica y Mogollón, 2004). Se colocó un brote por tubo de ensayo, los cuales fueron ubicados en cámaras de crecimiento, bajo condiciones controladas de temperatura ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), iluminación ( $13,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y fotoperíodo de  $16 \text{ h}$  durante dos meses.

**Experimentos de almacenamiento y grelado:** Una vez que los microbulbos estuvieron bien formados se procedió a eliminar los residuos del medio de cultivo y se mantuvieron a temperatura

ambiente para su curado o rápida deshidratación de las hojas externas (Figura 1).

Posterior a este proceso, los microbulbos fueron separados por sus diámetros ecuatoriales, a saber: diámetro 1 (entre  $10,9$  a  $15,6 \text{ mm}$ ) y diámetro 2 (entre  $5,5$  a  $8,9 \text{ mm}$  de diámetro), colocándose en bandejas plásticas con tapa para su traslado a cavas de almacenamiento con tres diferentes temperaturas ( $4$ ,  $10$  y  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y dos condiciones lumínicas (iluminación y oscuridad) durante  $45 \text{ días}$ . De esta manera se conformaron  $12$  tratamientos (Cuadro 1).

Se aplicó un diseño completamente al azar con  $12$  tratamientos y  $10$  repeticiones por tratamiento. Las variables a evaluar a los  $45 \text{ días}$  fueron: emisión del grelo, emisión de raíces, peso de microbulbos ( $\text{mg}$ ) y diámetro mayor de microbulbos expresado en  $\text{mm}$ .

Para analizar estadísticamente las variables emisión de grelo y emisión de raíces se empleó 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 diámetro de microbulbos se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia del  $5\%$ .



Figura 1. Microbulbos de ajo en etapa de almacenamiento.

Cuadro1. Tratamientos establecidos para evaluar el efecto del almacenamiento y gelado de microbulbos de ajo clon "Boconó".

Tratamiento	Diámetro	Temperatura (°C)	Condición Lumínica
T1	1	4	Iluminación
T2	2	4	Iluminación
T3	1	10	Iluminación
T4	2	10	Iluminación
T5	1	23	Iluminación
T6	2	23	Iluminación
T7	1	4	Oscuridad
T8	2	4	Oscuridad
T9	1	10	Oscuridad
T10	2	10	Oscuridad
T11	1	23	Oscuridad
T12	2	23	Oscuridad

### Experimentos en casa de cultivo

**Pre-desarrollo de microbulbos:** Durante esta etapa, los microbulbos fueron "pre-acondicionados" a los fines de estimular el gelado o rompimiento de la latencia antes de ser llevados a condiciones de canteros fijos. De esta manera, se consideró la procedencia de los microbulbos durante la etapa de almacenamiento, correspondiendo el tratamiento 1 a los microbulbos de diámetro 1, sometidos a condición de almacenamiento de 4 °C de temperatura e iluminación; y así sucesivamente (Cuadro 1).

El pre-desarrollo se realizó en cámara húmeda, empleando bandejas plásticas con tapa de 20x10x10 cm usando Promix® como sustrato. De igual manera, se trasplantaron cinco microbulbos por bandeja utilizándose cuatro bandejas por tratamiento. Las bandejas plásticas fueron ubicadas en la casa de cultivo y se mantuvieron tapadas por un lapso de 15 d, realizando riegos interdiarios hasta completar los 30 d.

Se utilizó un diseño de experimentos en bloques completos al azar con 12 tratamientos y 20 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas a los 15 y 30 d fueron: altura de brotes (cm) y número de hojas/brotes.

Para ambas variables se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia de 5%.

**Desarrollo de microbulbos en casas de cultivo:** Los microbulbos, procedentes de la etapa anterior fueron, trasferidos a canteros fijos en la casa de cultivo localizada en la estación del INIA-Cubiro. Se utilizó como sustrato una mezcla de tierra negra, pergamino de café descompuesto y aserrín de coco en una proporción de 2:2:1, el cual fue previamente esterilizado con Basamid. El material fue sembrado en hileras de 15 cm de largo, con una distancia de 5 cm entre plantas.

Para la siembra de este ensayo, se consideró la procedencia de los microbulbos correspondientes a la etapa de almacenamiento y gelado (Cuadro 1). Debido a la respuesta en la etapa anterior (pre-desarrollo), los tratamientos se diferenciaron en el número de brotes o rebrotes producidos, por lo que el número de plantas sembradas por tratamiento varió en este ensayo; transplantándose solo los mejores tratamientos (7) de la etapa anterior; a saber: T<sub>2</sub> y T<sub>11</sub> (23 °C iluminación y oscuridad), T<sub>9</sub> (10 °C oscuridad), T<sub>1</sub> (4 °C iluminación), T<sub>3</sub> y T<sub>10</sub> (10 °C iluminación y oscuridad) y T<sub>7</sub> (4 °C oscuridad), respectivamente.

Se empleó un diseño completamente al azar con 7 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento.

Las variables evaluadas relacionadas al follaje fueron: altura de la planta (cm), número de hojas de la planta, longitud de la hoja (cm) y ancho de la hoja (cm).

Las variables relacionadas con el bulbo cosechado fueron: diámetro ecuatorial del bulbo (mm), longitud del bulbo (mm), número de dientes por bulbo, peso fresco (g) y peso de 50 dientes (g). Para todas las variables se utilizó el análisis de la varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de significancia de 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Experimentos en laboratorio

La iniciación de los brotes a partir de ápices ocurrió en un 98% cuando fueron cultivados en el medio MS suplementado con 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 2ip, permitiendo el desarrollo de un solo brote por tubo de ensayo con promedios de altura de 4 a 4,6 cm. Con relación a la efectividad de este medio para la iniciación en *A. sativum* a partir de ápices, los resultados corroboran

investigaciones previas realizadas por Bhojwani (1980) y Zheng *et al.* (2003).

**Microbulbificación:** ocurrió a partir de brotes cultivados en MS suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de 2ip y 90 mg L<sup>-1</sup> de sacarosa, permitiendo el desarrollo de un solo microbulbo por tubo de ensayo. Los resultados evidencian la eficiencia del protocolo para la regeneración de microbulbos de *Allium sativum*, tal como lo ha indicado previamente Mujica y Mogollón (2004) y Mujica *et al.* (2008).

**Experimentos de almacenamiento y gelado:** el análisis de la varianza detectó diferencias significativas entre los 12 tratamientos evaluados para la variable emisión de grelo (Cuadro 2) y no significativas para emisión de raíces.

Para emisión de grelo, la prueba de comparación de medias separó los tratamientos en tres grupos (Cuadro 2). En un primer grupo, se ubicaron los materiales con diámetro 2 (Ø<sub>2</sub>), almacenados a 10 °C (T<sub>4</sub> y T<sub>10</sub>) en condiciones de iluminación y oscuridad, respectivamente.

En un segundo grupo e independientemente de las condiciones lumínicas y el diámetro, se agruparon los tratamientos con 10 °C (T<sub>3</sub> y T<sub>9</sub>),

Cuadro 2. Emisión de grelo en microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.), sometidos a tres temperaturas (4, 10, 23 °C) y dos condiciones lumínicas (iluminación y oscuridad), a los 45 días de su almacenamiento.

Tratamiento	Emisión de grelo	
	Media	Rango
4	0,6	82 a
10	0,6	82 a
2	0,0	70 b
8	0,1	52 ab
5	0,1	52 ab
11	0,2	58 ab
1	0,2	58 ab
7	0,3	64 ab
3	0,4	70 ab
9	0,4	70 ab
12	0,0	46 b
6	0,0	46 b

Valores con la misma letra no difieren al nivel de P≤0,05, según comparación múltiple de rangos. Estadística no paramétrica prueba de Kruskal-Wallis.

4 °C ( $T_1, T_8, T_7$ ) y 23 °C ( $T_5, T_{11}$ ); mientras que en el último grupo los tratamientos a 4 °C ( $T_2$ ) y 23 °C ( $T_6$  y  $T_{12}$ ), estos últimos con diámetros entre 5,5 a 8,9 mm ( $\varnothing_2$ ).

Con respecto al grelado, los resultados sugieren que los mecanismos fisiológicos son diferentes a 4 y 23 °C, lo cual coincide con autores como Vázquez *et al.* (2006) y James *et al.* (2009), quienes señalaron que entre 4-10 °C se producen cambios en el metabolismo de la fructosa y su transporte a los brotes, lo cual favorece la brotación y la producción de follaje. Así mismo, durante esta etapa se observó que independientemente de las condiciones lumínicas, los microbulbos con diámetros comprendidos entre 5,5 y 8,9 mm ( $\varnothing_2$ ) almacenados a 10 °C, emitieron grelo pero no raíces.

Similares resultados fueron reportados por Breswter (2001); Burba *et al.* (2007) y Burba (2009), quienes determinaron la rápida brotación en bulbos de ajo almacenados a 10 °C, en

comparación con una lenta brotación cuando se almacenaron a 4 y 23 °C. Lo anteriormente señalado, demuestra la importancia del control de la temperatura sobre la brotación tardía y precoz de los bulbos a ser utilizados como semillas.

Para las variables diámetro y peso de microbulbos la prueba de Tukey separó los tratamientos en 8 y 6 grupos, respectivamente (Cuadro 3).

Con respecto al diámetro, un primer grupo se conformó por los microbulbos almacenados en oscuridad a 10 °C ( $T_9$ ) con un promedio de 12,74 mm. Entre el segundo y octavo grupo se ubicaron, independientemente de las condiciones lumínicas, los materiales sometidos a 23 °C ( $T_5, T_6, T_{11}$ ), 10 °C ( $T_3, T_4, T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_1, T_2, T_7, T_8$ ); mientras que el menor promedio lo presentó el tratamiento a 23 °C y oscuridad ( $T_{12}$ ) con 6,46 mm.

Para el peso de microbulbos, los almacenados a 4 °C ( $T_7$ ) y 10 °C ( $T_9$ ) se ubicaron en un primer

Cuadro 3. Diámetro ecuatorial y peso de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.) a los 45 días de almacenamiento a tres temperaturas y dos condiciones lumínicas.

Tratamiento	Valores a los 45 días	
	Diámetro (mm)	Peso (mg)
9	12,74 a	761,3 a
7	12,37 ab	794,2 a
5	11,03 abc	675,8 ab
1	10,59 dcb	562,8 b
3	10,91 abc	570,5 b
11	10,69 abc	688,2 ab
2	9,26 cde	506,6 bc
8	8,54 def	356,3 cd
10	8,29 ef	352,6 cd
4	8,07 ef	315,6 d
6	7,91 ef	327,0 cd
12	6,46 f	238,1 d
CV%	26,5	29,3

Valores con la misma letra no difieren al nivel de  $P \leq 0,05$  según la prueba de Tukey.

grupo, con 794,2 y 761,3 mg, respectivamente, seguido por la condición a 23 °C ( $T_{11}$  y  $T_5$ ), en oscuridad e iluminación, respectivamente. Los restantes grupos se conformaron por los materiales almacenados a 10 °C ( $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_{10}$ ), 23 °C ( $T_6$ ,  $T_{12}$ ) y 4 °C ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_8$ ) con promedios de peso entre 570,5 a 238,1 mg.

Los resultados sugieren que durante esta etapa, los microbulbos con diámetros entre 10,9 a 15,6 mm ( $\emptyset$ ), almacenados bajo condiciones de oscuridad y temperaturas de 4 °C ( $T_7$ ) y 10 °C ( $T_9$ ), mostraron los mayores promedios para las variables evaluadas (diámetro y peso). Estos resultados se corresponden a lo reportado por Vázquez *et al.* (2006), quienes señalaron que entre 4-10 °C, la latencia en el ajo finaliza rápidamente favoreciendo la brotación y por ende el desarrollo de bulbos.

Por el contrario, a 23 °C de temperatura ( $T_6$  y  $T_{12}$ ) se retrasa la brotación incidiendo en una mayor pérdida de humedad y agua en los

tejidos, provocándose de esta manera una disminución de peso de los microbulbos bajo estas condiciones.

### Experimentos en casas de cultivo

**Desarrollo de microbulbos:** los análisis obtenidos para las variables altura de brotes (cm) y número de hojas en brotes regenerados a partir de microbulbos, mostraron diferencias significativas a los 15 y 30 días de evaluación durante la etapa de pre-desarrollo o pre-acondicionamiento antes de la etapa de vivero (Cuadro 4).

Para la variable altura de brotes, evaluada a los 15 días, la prueba de Tukey separó los tratamientos en cinco grupos. De esta manera, los microbulbos almacenados en oscuridad y temperaturas de 4 °C ( $T_7$ ) y 10 °C ( $T_9$ ), se ubicaron en un primer y segundo grupo, respectivamente, con promedios de 2,19 y 2,01 cm de altura; mientras que en el tercer y

Cuadro 4. Altura de brotes (cm) y número de hojas/brotos de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.), a los 15 y 30 días de pre-desarrollo bajo condiciones de cámara húmeda.

Tratamientos	15 días		30 días	
	Altura de brotes (cm)	Número de hojas	Altura de brotes (cm)	Número de hojas
7	2,19 a	1,49 a	4,73 a	3,58 ab
9	2,01 ab	1,46 ab	4,71 a	3,75 a
10	1,73 abc	1,30 abc	4,27 ab	3,48 abc
3	1,47 abc	1,32 abc	3,83 abc	3,50 abc
8	1,45 abc	1,27 abc	4,13 abc	3,41 bcd
4	1,44 abc	1,18 abc	3,37 bc	3,26 cd
1	1,35 abc	1,18 abc	3,54 bc	3,29 bcd
2	1,33 abc	1,14 abc	3,80 abc	3,35 bcd
11	1,14 bc	1,07 bc	3,40 bc	3,25 cd
5	1,00 c	1,00 c	3,30 bc	3,20 cd
6	1,00 c	1,00 c	3,17 c	3,17 d
12	1,00 c	1,00 c	3,30 bc	3,19 cd
CV%	15,9	14,4	12,8	13,3

Valores con la misma letra no difieren al nivel de  $P \leq 0,05$ , según comparación múltiple de rangos. Estadística no paramétrica prueba de Kruskal-Wallis.

cuarto grupo, independiente de las condiciones lumínicas, los tratamientos a 10 °C ( $T_{10}$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ), 23 °C ( $T_{11}$ ) y 4 °C ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_8$ ), quedando en el quinto grupo los materiales almacenados a 23 °C ( $T_{12}$ ,  $T_5$  y  $T_6$ ), con promedios de 1 cm de altura.

Para el número de hojas/brotes, la prueba de Tukey diferenció los tratamientos en cinco grupos. Los tratamientos en oscuridad y diámetro 1 ( $\emptyset_1$ ) bajo condiciones de 4 °C ( $T_7$ ) y 10 °C ( $T_9$ ) se ubicaron en el primer y segundo grupo, con promedios de 1,49, y 1,46 hojas, respectivamente. El tercero, cuarto y quinto grupo se conformó por las condiciones a 10 °C ( $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_{10}$ ), 23 °C ( $T_{11}$ ) y 4 °C ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_8$ ) tanto en oscuridad como en iluminación; mientras que en el último los tratamientos a 23 °C ( $T_5$ ,  $T_6$ ,  $T_{12}$ ) con promedios de 1 hoja por planta (Cuadro 4).

Trascurridos los 30 días de pre-desarrollo, la prueba de Tukey diferenció los tratamientos en cinco y seis grupos para las variables altura de brotes y número de hojas/brotes (Cuadro 4).

Con relación a la altura de brotes, los microbulbos almacenados en oscuridad a 4 °C ( $T_7$ ) y 10 °C ( $T_9$ ) conformaron el primer y segundo grupo, con promedios de altura de 4,73 y 4,71 cm, respectivamente; mientras que en el tercero, cuarto y quinto, independiente de las condiciones lumínicas y de su diámetro, se ubicaron los tratamientos a 10 °C ( $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_{10}$ ), 4 °C ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_8$ ) y 23 °C ( $T_5$ ,  $T_{11}$ ), con promedios entre 4,27 y 3,30 cm de altura; por su parte el último lugar lo ocupó el tratamiento a 23 °C iluminación ( $T_6$ ) con 3,17 cm.

Para el número de hojas, los tratamientos bajo condiciones de oscuridad a 10 °C ( $T_9$ ) y 4 °C ( $T_7$ ) se ubicaron en el primer y segundo grupo, con un promedio de cuatro hojas. El tercero, cuarto y quinto grupo se conformó, independiente de las condiciones lumínicas y su diámetro, por materiales almacenados a 10 °C ( $T_3$ ,  $T_4$ ,  $T_{10}$ ), 23 °C ( $T_5$ ,  $T_{11}$ ,  $T_{12}$ ) y 4 °C ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_8$ ); mientras que en el último grupo a 23 °C, iluminación ( $T_6$ ), con un promedio de 3 hojas por planta.

Durante la etapa de pre-desarrollo, los microbulbos con diámetros comprendidos entre 10,9 y 15,6 mm, previamente almacenados bajo condiciones de oscuridad y temperaturas de 4 y 10 °C ( $T_7$  y  $T_9$ ), respondieron favorablemente y registraron los mayores promedios para las

variables evaluadas (altura y número de hojas/brotes) durante las dos fechas de evaluación (15 y 30 días); mientras que independientemente de las condiciones lumínicas, los menores promedios se observaron en los materiales con diámetros entre 5,5 a 8,9 mm almacenados a 23 °C ( $T_{12}$  y  $T_6$ ).

Estos resultados son similares a lo señalado por Brewster (2001) quien determinó que la elongación de los brotes y la formación de hojas en diversos clones de *A. sativum* es mayor entre 5 a 10 °C, en comparación a aquellos materiales almacenados a temperaturas mayores a 20 °C.

Lo anteriormente señalado demuestra la importancia del control de la temperatura durante el almacenamiento, para garantizar el crecimiento y desarrollo de microbulbos durante la etapa de pre-desarrollo.

**Desarrollo de microbulbos en casas de cultivo:** los análisis obtenidos para las variables relacionadas con el follaje (altura de la planta, número de hojas, longitud y ancho de la hoja) y con el bulbo (diámetro y longitud del bulbo, número de dientes, peso fresco y peso de 50 dientes) mostraron diferencias significativas a los tres meses de desarrollo en casas de cultivo (Cuadro 5).

Para la variable altura de planta, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C tanto en iluminación como en oscuridad ( $T_6$  y  $T_{11}$ ), con promedios de altura de 8,13 y 8,11 cm, respectivamente. En un segundo grupo las condiciones de 10 °C oscuridad ( $T_9$ ) y 4 °C iluminación ( $T_1$ ); mientras que en el tercer grupo e independiente de las condiciones lumínicas a 10 °C ( $T_3$  y  $T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_7$ ), con promedios entre 5,69 a 6,09 cm.

Con relación al número de hojas, la prueba de Tukey separó los tratamientos en dos grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C, tanto en iluminación como en oscuridad ( $T_6$  y  $T_{11}$ ) con un promedio de 3,30 y 3,29 hojas; mientras que en un segundo grupo, e independientemente de las condiciones lumínicas, los microbulbos almacenados previamente a temperaturas entre 4 °C ( $T_1$ ,  $T_7$ ) y 10 °C ( $T_3$ ,  $T_9$ ,  $T_{10}$ ), con promedios entre 2,77 y 2,59 hojas.

Cuadro 5. Altura de planta (cm), número de hojas, longitud de la hoja (cm) y ancho de las hojas (cm) de brotes procedentes de microbulbos de *Allium sativum* L. a los tres meses bajo condiciones de casas de cultivo.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Número de hojas	Longitud de hoja (cm)	Ancho de hoja (cm)
6	8,13 a	3,30 a	6,91 a	1,76 a
11	8,11 a	3,29 a	6,52 ab	1,67 a
9	6,50 ab	2,77 b	5,13 c	1,39 b
1	6,41 ab	2,68 b	5,29 bc	1,35 b
3	6,09 c	2,65 b	4,89 c	1,40 b
7	5,79 c	2,61 b	4,61 c	1,31 b
10	5,69 c	2,59 b	5,06 c	1,29 b
CV%	15,9	13,8	12,6	11,3

Letras distintas indican diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

Para la variable longitud de la hoja, las condiciones a 23 °C tanto en iluminación como en oscuridad ( $T_6$  y  $T_{11}$ ) conformaron el primer y segundo grupo, con promedios de 6,91 y 6,52 cm, respectivamente; mientras que en el tercero y cuarto, independientemente de las condiciones lumínicas, se ubicaron los materiales almacenados a 10 °C ( $T_9$ ,  $T_3$ ,  $T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_1$  y  $T_7$ ), con promedios entre 5,29 y 4,61 cm.

Similar al comportamiento observado para el número de hojas, la prueba de Tukey separó al ancho de la hoja en dos grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C, tanto en iluminación como en oscuridad ( $T_6$  y  $T_{11}$ ) con un promedio de 1,76 y 1,67 cm, respectivamente y en el segundo grupo los restantes tratamientos a 10 °C ( $T_9$ ,  $T_3$ ,  $T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_1$  y  $T_7$ ), con promedios entre 1,40 a 1,29 cm.

En relación a las variables relacionadas con el bulbo, para el diámetro ecuatorial, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos (Cuadro 6). En un primer grupo se ubicaron los microbulbos almacenados en oscuridad a 23 °C ( $T_{11}$ ) con 6,46 mm; mientras que en el segundo bajo las condiciones a 10 °C ( $T_{10}$ ,  $T_9$  y  $T_3$ ) y 23 °C ( $T_6$ ), con promedios entre 6,33 y 5,31 mm. En el último grupo se ubicaron los materiales a

4 °C y oscuridad ( $T_7$ ) con promedio de 5,09 mm de diámetro.

Con respecto a la longitud del bulbo (mm), la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. Un primer grupo se conformó por los microbulbos almacenados en oscuridad tanto a 10 °C ( $T_9$ ) como a 23 °C ( $T_{11}$ ) con 5,83 y 5,75 mm, respectivamente. En un segundo grupo se ubicaron aquellos almacenados, tanto en iluminación como en oscuridad, a 23 °C ( $T_6$ ), 10 °C ( $T_3$  y  $T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_1$ ), con promedios entre 5,64 y 5,00 mm; mientras que en el tercer grupo en condiciones de oscuridad a 4 °C ( $T_7$ ) con promedio de 4,84 mm de longitud.

Para el número de dientes por bulbo, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En el primer y segundo grupo se ubicaron los microbulbos almacenados a 23 °C, tanto en oscuridad como iluminación ( $T_{11}$  y  $T_6$ ) con promedios de 6 a 4 dientes; mientras que en el tercer grupo, independientemente de las condiciones lumínicas, los tratamientos a 10 °C ( $T_9$ ,  $T_{10}$  y  $T_3$ ) y 4 °C ( $T_1$  y  $T_7$ ) con promedios entre 2 y 3 dientes por bulbo.

Para el peso fresco (g), la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En un primer grupo se ubicaron los microbulbos sometidos a 23 °C y oscuridad ( $T_{11}$ ) con 5,34 g, mientras que en el segundo los materiales almacenados

Cuadro 6. Diámetro ecuatorial del bulbo (mm), longitud del bulbo (mm), número de dientes, peso fresco (g), y peso de 50 dientes (g), de bulbos de *Allium sativum* L. cosechados a los tres meses de estar bajo condiciones de casas de cultivo.

Tratamiento	Diámetro ecuatorial (mm)	Longitud bulbo (mm)	Número dientes/bulbo	Peso fresco (g)	Peso 50 dientes (g)
11	6,46 a	5,75 a	5,56 a	5,34 a	4,07 b
9	6,33 ab	5,83 a	3,45 b	4,31 ab	7,88 a
6	6,28 ab	5,64 ab	4,41 ab	4,25 ab	1,40 c
3	6,14 ab	5,41 ab	3,50 b	4,00 ab	0,98 c
1	5,85 ab	5,21 ab	2,72 b	3,38 ab	0,30 c
10	5,31 ab	5,00 ab	2,61 b	3,05 b	0,30 c
7	5,09 b	4,84 b	2,49 b	2,97 b	0,30 c
CV%	11,2	10,3	13,3	10,2	11,8

Letras distintas indican diferencia significativa ( $P \leq 0,05$ ) según la prueba de Tukey.

a 10 °C en oscuridad ( $T_9$ ) y en iluminación a 10 °C ( $T_3$ ), 23 °C ( $T_6$ ) y 4 °C ( $T_1$ ). Por su parte, en el tercer grupo se ubicaron los tratamientos en oscuridad a 10 °C ( $T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_7$ ).

Con respecto al peso de 50 dientes, la prueba de Tukey separó los tratamientos en tres grupos. En un primer y segundo grupo se ubicaron los microbulbos almacenados en oscuridad a 10 °C ( $T_9$ ) y 23 °C ( $T_{11}$ ) con promedios de 7,88 y 4,07 mg, respectivamente; mientras que en el tercer grupo e independientemente de las condiciones lumínicas, los almacenados a 23 °C ( $T_6$ ), 10 °C ( $T_3$  y  $T_{10}$ ) y 4 °C ( $T_7$  y  $T_1$ ), con promedios entre 1,40 y 0,30 mg.

Durante la etapa de desarrollo, los microbulbos almacenados previamente a 23 °C ( $T_6$  y  $T_{11}$ ), presentaron los mayores promedios para las variables relacionadas con el follaje y el bulbo, seguido por la condición de oscuridad a 10 °C ( $T_9$ ); mientras que los menores promedios fueron observados en materiales almacenados en oscuridad a 4 °C ( $T_7$ ).

Los resultados indican que los microbulbos almacenados a 23 °C experimentaron un retraso en la formación de brotes y microbulbos durante las etapas de almacenamiento y pre-desarrollo; sin embargo, una vez transcurrido el ciclo de desarrollo en las casas de cultivo, las plantas crecieron vigorosamente y se desarrollaron mejor. Esto puede ser atribuido a que los

materiales vencieron el periodo de latencia más lentamente usando pocas sustancias de reserva.

Cabe destacar, que los microbulbos almacenados a 10 °C, además de presentar altos valores promedios para las variables evaluadas durante las etapas de almacenamiento y pre-desarrollo, lograron expresar todo su potencial y madurez fisiológica, al ser trasplantados al cantero, así como follajes y bulbos bien desarrollados o definidos en comparación de los materiales a 4 °C.

Con respecto a las condiciones de almacenamiento de los materiales en oscuridad y temperaturas de 4 °C ( $T_7$ ), los resultados indicaron que los microbulbos dirigieron todas las reservas de la planta durante las primeras etapas (almacenamiento y pre-desarrollo) hacia la producción de hojas, con una evidente pérdida de agua, humedad y peso en el bulbo durante la etapa de desarrollo.

Estos resultados corresponden a lo reportado previamente por Breswter (2001), Vázquez *et al.* (2006), Burba *et al.* (2007) y Burba (2009), entre otros, quienes afirman que los bulbos del ajo requieren para su formación diversas rutas de desarrollo, en donde las condiciones ambientales, el genotipo y el tamaño, son factores determinantes.

En lo que respecta a las condiciones ambientales, la temperatura de almacenamiento puede influir en gran medida en el óptimo crecimiento de los materiales cuando son transferidos a casas de cultivo. De esta manera, se demuestra que las temperaturas previas a la siembra, afectaron el vigor, el crecimiento y el desarrollo de los materiales al ser pasados a condiciones de campo. En este sentido, en el clon 'Boconó' se observó diferentes respuestas a la temperatura durante las sucesivas fases requeridas para la formación del bulbo; evidenciando con ello la importancia del control de la temperatura durante el almacenamiento sobre las diferentes etapas del cultivo.

### CONCLUSIONES

La información obtenida en esta investigación, es fundamental para el desarrollo de un programa de producción de semilla básica de ajo.

En este sentido, el almacenamiento de microbulbos de ajo, con diámetros comprendidos entre 10,9 a 15,6 mm, puede realizarse a temperaturas de 10 °C en oscuridad, ya que bajo estas condiciones se favoreció la ruptura del periodo de latencia rápidamente, así como la formación precoz del bulbo.

Asimismo, cuando los materiales previamente almacenados a esta temperatura fueron transferidos a casas de cultivo, los bulbos mostraron un óptimo diámetro y peso, además de dientes de mayor tamaño, lo cual facilitará la producción de un gran número de semillas de óptima "calidad" y con ello la ejecución de programas de mejoramiento genético en el clon 'Boconó'.

### RECOMENDACIÓN

La información generada permite recomendar a los agricultores de Cubiro, estado Lara, el almacenamiento de los bulbos o dientes de ajo a 10 °C de temperatura y condiciones de oscuridad, a los fines de minimizar la producción de bulbos rugosos, poco compactos y la formación de un solo diente entre otros trastornos fisiológicos, que suelen producirse cuando ocurren cambios bruscos y atípicos de temperatura propios de esta zona.

### AGRADECIMIENTO

A Paúl Azuaje Pardo y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por el financiamiento otorgado.

### LITERATURA CITADA

- Ahn J., G. Kim, K. Akram, K. Kim and J. Kwon. 2012. Effect of storage conditions on photostimulated luminescence of irradiated garlic. *Food Research International*. 47:315-320.
- Bhojwani, S. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*. 13:47-52.
- Burba, J., R. Ocañas, G. Lanzavechia y M. Paganini. 2007. Manejo de semilla básica de ajo en condiciones controladas. Ediciones: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 23 p.
- Burba, J. 2009. Mejoramiento genético y producción de "semilla" de ajo (*Allium sativum* L), posibilidad de adaptación a diferentes ambientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 44 p.
- Brewster, J. 2001. Las cebollas y otros *Alliums*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 266 p.
- James, C., V. Seignemartin y S. James. 2009. The freezing and supercooling of garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Refrigeration*. 32:253-260.
- Luciani, G., A. Mary, C. Pellegrini y N. Curvetto. 2006. Effect of explant and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant cell tissue and organs culture*. 87:139-143.
- Mathew, D., Y. Forer, H. Rabinowitch and R. Kamenetsky. 2011. Effect of long photoperiod on the reproductive and bulbing processes in garlic (*Allium sativum* L.) genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. 71:166-173.

- Moriconi, D., V. Conci and S. Nome. 1990. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton*. 51:145-151.
- Mujica, H. y N. Mogollón. 2004. Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. *Bioagro*. 16(1):55-60.
- Mujica, H., M. Sanabria, N. Mogollón y Y. Perozo. 2008. Formación *in vitro* del bulbo de ajo morado (*Allium sativum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*. 25(2):197-210.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A review medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures. *Physiología Plantarum*. 1:473-497.
- Nagakubo, T., A. Nagasawa and H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 32:175-183.
- Palmero, D., L. Gálvez, M. García, J. Gil and S. Benito. 2013. The effects of storage duration, temperature and cultivar on the severity of garlic clove rot caused by *Fusarium proliferatum*. *Postharvest Biology and Technology*. 78:34-39.
- Vázquez, M., G. López., E. Mercado, E. Castaño and F. León. 2006. Study and prediction of quality changes in garlic cv. Perla (*Allium sativum* L.) stored at different temperatures. *Scientia Horticulturae*. 108:127-132.
- Zheng S., B. Henken, F. Krens and C. Kik. 2003. The development of an efficient cultivar independent plant regeneration system from callus derived from apical and non-apical segments of garlic (*Allium sativum* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 39(3):288-292.