

## REGENERACIÓN *IN VITRO* DE *Allium sativum* L. A PARTIR DE SEGMENTOS DE HOJAS Y RAÍCES

Adriana Pardo<sup>1</sup>, Francisco Luna<sup>1</sup> y Nancy Hernández<sup>1</sup>

### RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie ampliamente cultivada por sus propiedades culinarias y farmacológicas. Por su condición estrictamente apomictica, el mejoramiento de este cultivo ha estado limitado a la selección clonal o a la presencia de mutantes espontáneos o inducidos. Sin embargo, las técnicas de cultivo *in vitro* surgen como una alternativa para la regeneración masiva de esta especie. Dado lo anteriormente señalado, se estableció un protocolo para la regeneración de plantas de ajo a partir de segmentos de hojas y de raíces. Se determinó el efecto de la combinación de auxinas y citocininas, así como la influencia del tipo de explante y su posición en la vitroplanta sobre la inducción de callos y su posterior regeneración a brotes. Los explantes extraídos de la sección apical de las raíces favorecieron la regeneración de callos, en comparación con segmentos basales de las hojas. Estos callos fueron transferidos a medio de regeneración de brotes constituido por MS (T<sub>1</sub>), MS con 0,01 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> de Kin (T<sub>2</sub>), y MS con 0,01 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> de BA (T<sub>3</sub>). La regeneración de brotes a partir de callos se favoreció en segmentos apicales de raíces cultivados en el medio MS suplementado con 2 mg·L<sup>-1</sup> de picloran y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip durante 3 meses. La máxima regeneración de brotes ocurrió en medio MS contentivo de 0,01 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> de Kin.

**Palabras clave adicionales:** Regeneración de callos, regeneración de brotes, cultivo de tejidos, organogénesis.

### ABSTRACT

#### *In vitro* regeneration of *Allium sativum* L. through leaf and root segments

Garlic (*Allium sativum* L.) is a very important and widely cultivated crop, which is known for its culinary and pharmacological use. Until present, garlic breeding has been limited to clonal selection or presence of spontaneous or induced mutants. However, it becomes increasingly feasible nowadays the massive garlic regeneration by tissue culture. Therefore, in this study we established an *in vitro* regeneration protocol for this species using leaf and root segments. The effect of auxin and cytokinin level, and the explants position of the leaf and root segments, on callus induction and shoot regeneration were studied. Callus induction on apical root segments was significantly higher those on basal segments. Callus were transferred to shoot regeneration medium consisting of MS medium supplemented with MS (T<sub>1</sub>), 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D and 5 mg·L<sup>-1</sup> Kin (T<sub>2</sub>), and 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D with 5 mg·L<sup>-1</sup> BA (T<sub>3</sub>). Shoot regeneration from callus was favored on apical root segments growing in MS medium containing 2 mg·L<sup>-1</sup> picloran with 1 mg·L<sup>-1</sup> 2ip for 3 months. Maximum shoot regeneration occurred in MS medium containing 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D and 5 mg·L<sup>-1</sup> of Kin.

**Additional key words:** Callus induction, shoot regeneration, tissue culture, organogenesis.

### INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una hortaliza cultivada para consumo industrial, farmacológico o para su procesamiento como condimento fresco. Debido a sus propiedades medicinales, esta especie ha sido utilizada como tratamiento para la prevención del cáncer y de enfermedades cardiovasculares (Iciek et al., 2009); también destaca por su acción antiinflamatoria, antioxidante, antibiótica y anticoagulante, atribuidas a más de dos mil compuestos

biológicamente activos (Block, 2009). En Venezuela el cultivo del ajo, al igual que otras hortalizas, posee una importancia social y económica; en primer lugar porque constituye una fuente de empleo en diversas regiones del país y en segundo lugar por constituir una fuente de vitaminas y minerales en la dieta de los venezolanos.

Debido a la condición estrictamente agámica o apomictica, la única vía de propagación de esta especie es mediante los bulbillos o dientes que se forman en el bulbo, estimándose entre 10 a 30

Recibido: Octubre 26, 2010

Aceptado: Julio 1, 2011

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología Vegetal, Decanato de Agonomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto. Venezuela. e-mail: apardo@ucla.edu.ve; lunafrank85@gmail.com; nhernandez@ucla.edu.ve

bulbillos, dependiendo del cultivar, lo cual conlleva a que la tasa de multiplicación por esta vía sea muy baja. Aunado a esto, el uso de dientes o bulbillos no certificados para la siembra por parte de los agricultores, ha traído una serie de inconvenientes fitopatológicos debido a la contaminación de los suelos y proliferación de patógenos de una cosecha a otra (Meredith, 2008).

El cultivo *in vitro* se muestra como una alternativa para superar la problemática previamente indicada, ya que permite la propagación masiva de materiales sanos y libres de patógenos y/o enfermedades para su uso inmediato por parte de los productores. De esta manera, es posible regenerar en poco tiempo una gran cantidad de plantas genéticamente idénticas a la planta madre (organogénesis directa) o promover la variación somaclonal (organogénesis indirecta) para la obtención de clones con características de interés agronómico como alto rendimiento y/o resistencia a plagas y enfermedades (Azcón y Talón, 2008). Diversas investigaciones han sido realizadas en *A. sativum* para obtener microbulbos, embriones y/o brotes a partir de callos aplicando las técnicas del cultivo *in vitro*. Entre éstas se pueden mencionar la producción de microbulbos (Mujica et al., 2008), embriones (Young et al., 2009; Nasim et al., 2010), así como la producción de brotes a partir de callos utilizando como explantes hojas y/o raíces cultivados en diversas combinaciones de reguladores de crecimiento como ANA, 2,4-D, picloran y Cinetina (Zheng et al., 2003; Khan et al., 2004; Luciani et al., 2006). Por lo antes señalado, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo para la regeneración *in vitro* de *A. sativum* a partir de segmentos de hojas y raíces.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de la Unidad de Biotecnología Vegetal, ubicado en el Decanato de Agronomía de la UCLA, en Tarabana, estado Lara, Venezuela. Al inicio, se colectaron bulbos de tamaño comercial de ajo tipo morado (clon UCLA-1) provenientes de un ensayo de campo localizado en Cubiro, estado Lara. Los bulbos fueron disgregados en sus dientes y almacenados entre 8 y 10 °C de temperatura hasta el desarrollo del

grello (30 a 45 días aproximadamente).

Se emplearon ápices caulinares provenientes de dientes de ajo seleccionados de acuerdo a su tamaño (entre 4 a 5 mm). Los dientes se sometieron a un protocolo de desinfección que consistió en primer lugar en tres lavados con agua corriente; luego fueron transferidos a una solución jabonosa de yodo (Betadine) al 10 % durante 10 min para posteriormente sumergirlos en una solución de benomil (Benlate 4,0 g·L<sup>-1</sup>) durante 15 min, con tres gotas de adherente (Citowett plus) por cada litro de agua. Seguidamente, se colocaron en una solución fungicida-bactericida (Kasumin 4 ml·L<sup>-1</sup>) durante 15 min y finalmente en una solución de cloro comercial al 10 %, durante 15 min. Entre cada paso, se hicieron tres lavados sucesivos con agua destilada-esterilizada. Todos los procedimientos anteriores se realizaron en recipientes de vidrio sobre planchas de agitación continua. Finalizado el protocolo de desinfección, el aislamiento de los ápices, así como los siguientes pasos del cultivo *in vitro* se ejecutaron bajo una cámara IAS de flujo laminar.

Los ápices con 4 ó 6 primordios foliares de 3 a 5 mm de longitud fueron cultivados en tubos de ensayo de 25x150 mm contentivos del medio Murashige y Skoog, constituido por sus sales inorgánicas en concentración completa, 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y vitaminas: tiamina HCL (0,1 mg·L<sup>-1</sup>), ácido nicotínico (0,5 mg·L<sup>-1</sup>), HCL piridoxina (0,5 mg·L<sup>-1</sup>) y mioinositol (100 mg·L<sup>-1</sup>). Se empleó 0,5 mg·L<sup>-1</sup> del regulador 2-isopenteniladenina (2ip) y 0,1 mg·L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA) de acuerdo al protocolo establecido por Bhojwani (1980) y Zheng et al. (2003). Una vez realizada la siembra, los tubos se ubicaron de manera aleatoria en una cámara de crecimiento, a temperatura de 25±2 °C, iluminación de 17 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> y fotoperiodo de 16 h. A los 30 días se determinó el porcentaje de iniciación de brotes, el número de brotes y la altura de los brotes.

### Regeneración de callos a partir de segmentos de hojas y raíces

**Experimento 1.1:** Este ensayo se realizó para determinar el efecto de la porción extraída del explante sobre el porcentaje de regeneración de callos. Para ello, se tomaron segmentos basales de las hojas (5 mm<sup>2</sup>), así como apicales de las raíces (5 mm), los cuales fueron cultivados en medio MS

con adición de reguladores de crecimiento (Cuadro 1). Se efectuó un subcultivo a los 45 días.

**Cuadro 1.** Concentración de los reguladores de crecimiento adicionados al medio MS para la regeneración de callos en *Allium sativum* a partir de segmentos basales de hojas y apicales de raíces

Tratamiento	ANA	2ip	2,4-D	Kin
	mg·L <sup>-1</sup>			
T <sub>1</sub>				
T <sub>2</sub>	3	1		
T <sub>3</sub>			1	1
T <sub>4</sub>			1	2
T <sub>5</sub>			1	3

Se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (5x2), correspondiente a los cinco tratamientos evaluados y dos tipos de explante. Se utilizaron cinco repeticiones, considerándose tres explantes por frasco como unidad experimental. A los 45 y 90 días se evaluó el porcentaje de regeneración de callos.

**Experimento 1.2:** En función de los resultados obtenidos en el experimento anterior, se emplearon segmentos apicales de las raíces para determinar el efecto de once combinaciones de los reguladores ANA, 2,4-D, Kin, picloran y 2ip sobre el porcentaje de regeneración de callos. Los segmentos apicales de las raíces fueron cultivados en medio MS sólido, manteniendo los mismos componentes utilizados en la etapa anterior y la combinación de los reguladores de crecimiento, tal como se muestra en el Cuadro 2.

El pH del medio se ajustó a 5,7±0,1, el cual se dispensó en tubos de ensayo de 25x150 mm, distribuidos en alícuotas de 15 mL por tubo. Una vez realizada la siembra, los tubos de ensayo se ubicaron en cámara de crecimiento a temperatura de 25±2 °C, fotoperiodo de 16 horas y 17 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> de iluminación. Se realizó un subcultivo a los 45 días.

Se aplicó un diseño de bloque aleatorizado con once combinaciones de los reguladores de crecimiento y cinco repeticiones. Se consideró un explante por tubo como unidad experimental. Las variables evaluadas a los 90 días del experimento fueron: porcentaje de regeneración de callos y diámetro mayor del callo o mayor distancia de la porción media o central del callo. A los resultados

se aplicó análisis de la varianza y prueba de medias de Duncan.

**Cuadro 2.** Concentración de los reguladores de crecimiento empleados para la regeneración de callos en *Allium sativum* a partir de segmentos apicales de raíces

Tratamiento	ANA	2,4-D	Kin	Picloran	2ip
	mg·L <sup>-1</sup>				
T <sub>1</sub>		1			1
T <sub>2</sub>		2			1
T <sub>3</sub>		3			1
T <sub>4</sub>	1				1
T <sub>5</sub>	2				1
T <sub>6</sub>	3				1
T <sub>7</sub>		1	1		1
T <sub>8</sub>		1	2		1
T <sub>9</sub>		1	3		1
T <sub>10</sub>				1	1
T <sub>11</sub>				2	1

### Regeneración de brotes a partir de callos

**Experimento 2.1:** Se utilizaron como explantes callos de 4x4 mm provenientes de la etapa anterior, los cuales fueron cultivados en medio MS constituido por sus sales inorgánicas en concentración completa y tres combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D, BA y Cinetina: T<sub>1</sub>=MS; T<sub>2</sub>=0,01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> Kin y T<sub>3</sub>= 0,01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> BA.

El medio se dispensó en frascos de vidrio de 120 mL distribuidos en alícuotas de 20 mL por frasco. El ajuste del pH y las condiciones de la cámara de crecimiento fueron similares a los del experimento 1.2. Se transfirió a medio fresco a los 30 días.

Se aplicó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, diez repeticiones y dos callos por frasco como unidad experimental. A los 60 días se evaluó el porcentaje de regeneración de brotes, altura de los brotes y número de brotes.

**Experimento 2.2:** Se utilizaron como explantes callos de 4x4 mm previamente cultivados, durante 90 días, en once combinaciones de los reguladores de crecimiento ANA, 2,4-D, Kin, picloran y 2ip (Cuadro 2). Los callos seleccionados fueron transferidos al medio MS constituido por sus sales inorgánicas en concentración completa con 0,01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> Kin (T<sub>2</sub>), ya que en

este medio se obtuvieron los mayores porcentajes de regeneración de brotes, según el experimento 2.1.

El uso de los frascos de vidrio, el ajuste del pH y las condiciones de la cámara de crecimiento fueron similares a los del experimento 2.1. Se realizó un subcultivo a los 30 días al medio de brotes MS con 0.01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> Kin (T<sub>2</sub>).

Se aplicó un diseño completamente al azar con once tratamientos correspondientes a la procedencia del explante utilizado (Cuadro 2) y diez repeticiones por tratamiento. La unidad experimental consistió de 2 callos por frasco. A los 60 días se evaluó el efecto de la composición del medio sobre el porcentaje de regeneración de brotes. Se empleó el análisis de la varianza y prueba de Duncan para la comparación de medias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Iniciación de brotes a partir de ápices

La iniciación ocurrió en el 98 % de los ápices cultivados en MS suplementado con 0,5 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip y 0,1 mg·L<sup>-1</sup> de ANA, permitiendo el desarrollo de un solo brote por tubo de ensayo con promedios de altura de 4 a 4,6 cm. En 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). Así mismo, el protocolo de desinfección empleado garantizó un mínimo porcentaje de contaminación (5 %).

### Regeneración de callos a partir de segmentos de hojas y raíces

**Experimento 1.1:** Se detectaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre las cinco combinaciones de los reguladores de crecimiento utilizados (Cuadro 3). Asimismo, se observaron claras tendencias entre los promedios de los dos tipos de explantes (segmento basal de la hoja y apical de la raíz).

La prueba de medias separó tres grupos cuando se utilizaron segmentos basales de hojas. En un primer grupo, los explantes cultivados en MS suplementado con 3 mg·L<sup>-1</sup> ANA y 1 mg·L<sup>-1</sup> 2ip (T<sub>2</sub>), presentaron 44,6% y 55,8% de regeneración de callos a los 45 y 90 días, respectivamente. En un segundo grupo, la combinación 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D

y 2 mg·L<sup>-1</sup> de Kin (T<sub>4</sub>), propició un 17,8 y 26,1 % a los 45 y 90 días; mientras que sin reguladores de crecimiento (T<sub>1</sub>) y MS suplementado con 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 3 mg·L<sup>-1</sup> de Kin (T<sub>5</sub>), los segmentos basales de hojas no respondieron hacia la regeneración de callos.

**Cuadro 3.** Regeneración de callos (%) de *A. sativum*, obtenidos a partir de segmentos basales de hojas y apicales de raíces a 45 y 90 días de su cultivo en cinco combinaciones de ANA, 2ip, 2,4-D y Kin

Tratamiento	Hojas		Raíces	
	45 días	90 días	45 días	90 días
T <sub>1</sub>	0,0 c	0,0	0,0 c	0,0
T <sub>2</sub>	44,6 a	55,8 a	62,6 b	75,4 b
T <sub>3</sub>	0,0 c	0,00	0,0 c	0,0
T <sub>4</sub>	17,8 b	26,1 b	75,4 a	84,2 a
T <sub>5</sub>	0,0 c	0,0	0,0 c	0,0

Identificación de los tratamientos de acuerdo al Cuadro 1. Valores con letras distintas difieren significativamente según la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Los resultados indican que los segmentos basales de hojas requirieron una mayor concentración de la auxina ANA que de la citocinina 2ip para inducir la regeneración de callos. Probablemente, en esta zona meristemática de crecimiento activo donde se da la síntesis natural de auxinas, la aplicación de altas concentraciones de ANA, junto con bajas dosis de 2ip, suprimió el proceso morfogénico y con ello propició la proliferación de células tipo callo.

Cuando se utilizaron los explantes de segmentos apicales de raíces, el mayor porcentaje de regeneración de callos se presentó en el medio MS suplementado con 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 2 mg·L<sup>-1</sup> de Kin (T<sub>4</sub>) con 75,4 y 84,2% a los 45 y 90 días respectivamente; seguido por la combinación de 3 mg·L<sup>-1</sup> ANA y 1 mg·L<sup>-1</sup> 2ip (T<sub>2</sub>) con 62,6 y 75,4 %. Cabe destacar que aun cuando la regeneración de callos a partir de raíces en el tratamiento con 3 mg·L<sup>-1</sup> ANA y 1 mg·L<sup>-1</sup> 2ip fue superior a lo observado en segmentos basales de las hojas (Cuadro 3), la aplicación de 1 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 2 mg·L<sup>-1</sup> Kin (T<sub>4</sub>), indujo un mayor porcentaje de regeneración de callos en los segmentos radicales. En este caso, se requirió una mayor concentración de la citocinina Kin que de la auxina 2,4-D para inducir la proliferación de callos. Dado que en las raíces ocurre naturalmente

la síntesis de citocininas, probablemente la adición de Kin propició un aumento de la división celular y con ello la proliferación de células tipo callo. Contrariamente, la aplicación de altas dosis de esta citocinina (T<sub>5</sub>) repercutió negativamente ya que no se indujo la regeneración de ningún tipo de célula. Estos resultados demuestran que la regeneración de un callo depende del tipo de explante y de la combinación de los reguladores de crecimiento utilizados. Similar a los resultados de esta investigación, estudios previos señalan que la incorporación de combinaciones de 2,4-D con Kin ó 2,4-D con 2ip, en los medios nutritivos, promueve la regeneración de callos a partir de raíces (Myers y Simon, 1998; Robledo et al., 2000; y Khan et al., 2004).

En relación al tipo de explante, al igual que en investigaciones previas (Barandiaran et al., 1999; Khan et al., 2004; Khar et al., 2005), la mejor respuesta para el porcentaje de regeneración de callos se observó en los segmentos apicales de raíces. En virtud de ello, los restantes experimentos de regeneración *in vitro* fueron realizados utilizando los segmentos apicales de las raíces como explante.

**Experimento 1.2:** Se detectaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre las 11 combinaciones de los reguladores de crecimiento utilizados para los porcentajes de regeneración y diámetro mayor del callo (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Regeneración (%) y diámetro mayor de callos de *A. sativum* obtenidos a partir de segmentos apicales de raíces a los 90 días de su cultivo en 11 combinaciones de los reguladores ANA, 2,4-D, Kin, Picloran y 2ip

Tratamiento	Regeneración	Diámetro
T <sub>1</sub>	39,2 e	3,3 c
T <sub>2</sub>	67,6 cd	3,3 c
T <sub>3</sub>	75,4 c	4,7 b
T <sub>4</sub>	65,9 cd	6,6 a
T <sub>5</sub>	59,6 d	5,6 ab
T <sub>6</sub>	86,6, b	3,4 c
T <sub>7</sub>	47,2 e	4,3 b
T <sub>8</sub>	61,5 d	3,3 c
T <sub>9</sub>	64,6 d	5,2 ab
T <sub>10</sub>	93,3 ab	5,8 ab
T <sub>11</sub>	96,9 a	5,1 ab

Identificación de los tratamientos de acuerdo al Cuadro 2. Medias con letras distintas difieren significativamente según la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

La prueba de medias separó los tratamientos en siete grupos para el porcentaje de regeneración de callos y cuatro grupos para el diámetro del callo. Con relación a la regeneración de callos, en un primer y segundo grupo se ubicaron los tratamientos con concentraciones de 2 a 1 mg·L<sup>-1</sup> picloran (T<sub>11</sub>-T<sub>10</sub>) con 96,9 y 93,3 %, respectivamente. En un tercer y cuarto grupo quedaron los tratamientos T<sub>6</sub> y T<sub>3</sub>. El quinto grupo se conformó con el T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub>, el sexto con T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub> y T<sub>5</sub>, y el séptimo con T<sub>7</sub> y T<sub>1</sub>.

Los resultados indicaron que los tratamientos con concentraciones de 1 a 2 mg·L<sup>-1</sup> de picloran, (T<sub>11</sub> y T<sub>10</sub>), 3 mg·L<sup>-1</sup> ANA (T<sub>6</sub>) y 3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D (T<sub>3</sub>), todos con 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip, propiciaron los mayores porcentajes de regeneración de callos; mientras que la aplicación de dos citocininas (2ip y Kin) en combinación con una auxina como el 2,4-D, repercutió de manera negativa sobre la diferenciación. Varias investigaciones reportan los efectos de estos reguladores en diferentes cultivares de ajo (Young et al., 2009). Generalmente, auxinas como el ANA, picloran y 2,4-D son utilizadas solas en el medio y/o en combinación con citocininas como la Kin y el 2ip, con el fin de determinar su potencialidad para suprimir la morfogénesis y con ello la rápida proliferación de células tipo callo. La mayoría de las investigaciones realizadas en ajo y otras especies, han reportado una mayor eficiencia en la regeneración de callos con el 2,4-D; mientras que otros con el picloran y/o ANA (Young et al., 2009; Zdravkovic et al., 2010; Simoes et al., 2010), lo cual demuestra que cada especie o cultivar requiere de un balance apropiado de los reguladores de crecimiento para determinar una ruta específica de diferenciación celular. Finalmente, es importante destacar el efecto de las concentraciones utilizadas sobre la regeneración de callos, ya que concentraciones elevadas de auxinas como 2,4-D, picloran o ANA, pueden causar incrementos en la inestabilidad genética de las células y/o riesgo de variación somaclonal (Mukhopadhyay et al., 2004; Tubic et al., 2011).

Con relación al diámetro del callo, los segmentos apicales de raíces cultivados en MS en combinación con 1 mg·L<sup>-1</sup> ANA y 1 mg·L<sup>-1</sup> 2ip (T<sub>4</sub>), presentaron un diámetro mayor de 6,6 mm, seguidos por los tratamientos T<sub>10</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>9</sub> y T<sub>11</sub> con 5,8; 5,6; 5,2 y 5,1 mm, respectivamente. En un tercer grupo quedaron T<sub>3</sub> y T<sub>7</sub> los cuales

mostraron diámetros de 4,7 y 4,3 mm, respectivamente, mientras que en un cuarto grupo estuvieron T<sub>6</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> y T<sub>8</sub>, los cuales presentaron los menores promedios para esta variable.

Similar a los resultados obtenidos para el porcentaje de regeneración de callos, la tendencia general fue una mayor respuesta en los explantes cultivados con auxinas como el ANA, picloran y 2,4-D combinadas con citocininas como el 2ip y Kin, corroborando la importancia de un balance apropiado de ambos tipos de reguladores, en este caso sobre la ausencia de organogénesis, que condujo a la proliferación de callos.

### Regeneración de brotes a partir de callos

**Experimento 2.1:** Se detectaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los tres tratamientos evaluados para el porcentaje de regeneración de brotes a partir de callos, la altura y el número de brotes. La prueba de medias diferenció tres grupos, con un máximo porcentaje de regeneración de brotes en los explantes cultivados en el medio MS suplementado con 0,01 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> de Kin (T<sub>2</sub>), seguido por la combinación 0,01 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> de BA (T<sub>3</sub>) mientras que no se observó respuesta en el tratamiento testigo (T<sub>1</sub>) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Regeneración de brotes, altura y número de brotes por callos de *A. sativum*, obtenidos a partir de segmentos apicales de raíces a 60 días de su cultivo en tres combinaciones de 2,4-D, Kin y BA

Tratamiento	Regeneración	Altura de brote	Número de brotes
T <sub>1</sub>	0,0 c	0,0 c	0,0 c
T <sub>2</sub>	24,5 a	9,9 a	2,2 b
T <sub>3</sub>	16,3 b	8,2 b	3,9 a

T<sub>1</sub>=MS; T<sub>2</sub>= 0,01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> Kin y T<sub>3</sub>= 0,01 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D y 5 mg·L<sup>-1</sup> BA. Valores con letras distintas difieren significativamente según la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Para la altura y el número de los brotes también hubo tres grupos. La máxima altura se observó en el tratamiento T<sub>2</sub> con 9,9 cm de altura, seguido por el T<sub>3</sub> con 8,2 cm, mientras que en el T<sub>1</sub> se obtuvo el mayor número de brotes/callo (3,9) seguido por T<sub>2</sub> con 2,2 brotes/callo. En ausencia de reguladores de crecimiento (T<sub>1</sub>) no hubo caulogénesis.

Estos resultados indican que la composición del medio nutritivo repercutió sobre la capacidad de regenerar brotes. Al respecto, se requirió una mayor proporción de citocininas (Kin, BA) que de auxinas (2,4-D) en el medio, lo cual se corresponde a lo observado en investigaciones previas (Barandiaran et al., 1999; Zdravkovic et al., 2010; Tubic, et al., 2011). En este caso, las citocininas parecen jugar un papel específico para la regeneración de brotes a partir de callos, probablemente al determinar la ruta de la diferenciación hacia la caulogénesis.

**Experimento 2.2:** La prueba de medias separó los tratamientos en cuatro grupos (Cuadro 6). Sólo se propició caulogénesis en cinco de once tratamientos (T<sub>2</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>6</sub>, T<sub>10</sub> y T<sub>11</sub>). Los callos previamente cultivados en 1 mg·L<sup>-1</sup> de picloran y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip (T<sub>10</sub>) presentaron el mayor porcentaje de regeneración de brotes, seguido de los tratamientos con las combinaciones de 3 mg·L<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip (T<sub>6</sub>), 2 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip (T<sub>2</sub>) y 2 mg·L<sup>-1</sup> de picloran y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip (T<sub>11</sub>). El menor promedio se observó con la combinación de 1 mg·L<sup>-1</sup> de ANA y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip (T<sub>4</sub>).

**Cuadro 6.** Porcentaje de regeneración de brotes a partir de callos de *A. sativum* cultivados en cinco combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D, ANA, Picloran y 2ip

Tratamiento	Regeneración de brotes
T <sub>2</sub>	17,3 b
T <sub>4</sub>	8,2 c
T <sub>6</sub>	34,2 ab
T <sub>10</sub>	49,2 a
T <sub>11</sub>	15,3 b

Identificación de los tratamientos de acuerdo al Cuadro 2. Valores con letras distintas difieren significativamente según la prueba de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Los resultados indican que la aplicación del picloran en el medio de regeneración de callos favoreció la posterior regeneración y/o producción de brotes (T<sub>10</sub>). El uso de altas dosis de ANA en el medio de callos (3 mg·L<sup>-1</sup> ANA) también propició la formación de brotes; mientras que en el caso del 2,4-D sólo la combinación de 2 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1 mg·L<sup>-1</sup> de 2ip la favoreció. Esto confirma la importancia de mantener un balance apropiado

entre auxinas como el ANA, 2,4-D y picloran y citocininas como la Kin, BA y 2ip en las diferentes etapas de regeneración. Se infiere que para la etapa de regeneración de callos de ajo a partir de segmentos apicales de raíces, la incorporación al medio MS de concentraciones entre 1 a 3 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, picloran y ANA en combinación con 1 a 2 mg·L<sup>-1</sup> de Kin o 2ip, favoreció la regeneración de callos; mientras que para la inducción de brotes a partir de callos, resultó mejor el empleo de mayores concentraciones de citocininas como Kin o BA (5 mg·L<sup>-1</sup>) que de auxinas como el 2,4-D (0,01 mg·L<sup>-1</sup>).

### CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo para la regeneración de brotes a partir de callos en *A. sativum* L. por organogénesis indirecta, utilizando principalmente segmentos apicales de raíces. El mismo puede ser utilizado para la ejecución de programas de mejoramiento genético aplicando métodos biotecnológicos, lo cual resulta de gran relevancia para la búsqueda de variabilidad, bien sea a través de la variación somaclonal o por transformación genética, en esta especie estrictamente apomíctica.

### AGRADECIMIENTO

A mi hijo, Paúl Azuaje Pardo.

### LITERATURA CITADA

- Azcón, J. y M. Talón. 2008. Fundamentos de Fisiología Vegetal. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. España. 651 p.
- Barandiaran, X., N. Martín, M. Rodríguez, A. Pietro y J. Martín. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Report. 18: 434-437.
- Bhojwani, S. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. Scientia Horticulturae 13: 47-52.
- Block, E. 2009. Garlic and other Alliums: The Lore and the Science. Ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge, Reino Unido. 474 p.
- Iciek, M., I. Kwiecien y L. Wodek. 2009. Biological properties of garlic and garlic derived organosulfur compounds. Environmental Molecular Mutagenesis 50: 247-265.
- Khan, N., M. Alam y U. Nath. 2004. *In vitro* regeneration of garlic through callus culture. Journal of Biological Sciences 4(2): 189-191.
- Khar, A., R. Bhutani, N. Yadav y V. Chowdhury. 2005. Effect of explant and genotype on callus culture and regeneration in onion (*Allium cepa* L.). Akdeniz Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi 18(3): 397-404.
- Luciani, G., A. Mary, C. Pellegrini y N. Curvetto. 2006. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. Plant Cell Tissue and Organs Culture 87: 139-143.
- Meredith, T. 2008. The Complete Book of Garlic: A Guide for Gardeners, Growers and Serious Cooks. Ed. Timber Press. 332 p.
- Mukhopadhyay, M., P. Sengupta, S. Mukhopadhyay y S. Sen. 2004. *In vitro* stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability. Scientia Horticulturae 104(1): 1-9.
- 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.
- Myers, J. y P. Simon. 1998. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. Plant Cell Report. 17: 726-730.
- Nasim, S., A. Mujib, R. Kapoor, S. Fatima y J. Aslam. 2010. Somatic embryogenesis in *Allium sativum* L. (cv. Yamuna safed 3): Improving embryo maturation and germination with PGRs and carbohydrates. Anales de Biología 32: 1-9.

14. Robledo, A., V. Villalobos y A. Jofre. 2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. In *Vitro Cell.* 36: 416-419.
15. Simoes, C., N. Albarello, C. Callado, T. Carvalho y E. Mansur. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(3): 679-689.
16. Tubic, L., S. Zdravkovic, N. Mitic, J. Milojevic, D. Calic y B. Vinterhalter. 2011. Plant regeneration from transverse stalk section of chive plants. *Romanian Biotechnological Letters* 16(1): 55-60.
17. Young, S., H. Hoon, Y. Kyoung, N. Park y S. Park. 2009. Plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) via somatic embryogenesis. *Scientific Research and Essay* 4(13): 1569-1574.
18. Zdravkovic, S., J. Milojevic, L. Tubic, D. Calic, N. Mitic y B. Vinterhalter. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 101: 237-244.
19. Zheng, S., B. Henken, F. Krens y 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.