

## Capítulo 3

# Producción de plantas de ajo libres de virus

### **Mónica Madariaga V.**

Investigadora Virología, INIA La Platina / mmadariaga@inia.cl

### **Isabel Ramírez A.**

Profesional de apoyo, Virología INIA La Platina

### **Yael Nuñez N.**

Asistente de investigación, Virología INIA La Platina

### **Andrea Molina D.**

Asistente de investigación, Virología INIA La Platina

### **Marcelo Horta G.**

Técnico Agrícola, INIA Rayentué

## **3.1 Introducción**

El cultivo de ajo se ve afectado por diversos virus capaces de influir negativamente en el rendimiento de las plantas, debido a que disminuyen el calibre del bulbo, provocando con ello, importantes pérdidas económicas para la agricultura. Tal como se mencionó en el Capítulo 2 de este boletín, las especies virales capaces de afectar el ajo son a lo menos 13, las cuales se perpetúan en el cultivo debido al tipo de propagación vegetativa que tiene esta hortaliza, la cual facilita la transmisión vertical de estos patógenos.

Debido a que, a diferencia de otros patógenos como hongos y bacterias, los virus no tienen tratamiento químico, la manera más adecuada de controlar una infección viral, es a través de la prevención con prácticas culturales como por ejemplo iniciar el cultivo con material libre de virus. Lamentablemente, para el cultivo del ajo, en Chile no existen plantas con estas características, por lo cual el Laboratorio de Virología de INIA La Platina, bajo el alero del proyecto FIC "Valorización y Diversificación del Cultivo del Ajo", financiado por el Gobierno Regional de O'Higgins, generó, mediante técnicas biotecnológicas (cultivo de meristemos y propagación *in vitro*), plantas de ajo libres de virus, esperando aumentar los rendimientos que actualmente tienen los productores

de ajo de la región y, de este modo, beneficiar directamente a la pequeña agricultura y potenciar el cultivo de ajo regional.

### 3.2 Saneamiento de plantas de ajo de la región de O'Higgins

El saneamiento de plantas de ajo se realizó mediante cultivo de meristemas, lo cual consiste en cultivar, bajo condiciones *in vitro*, el domo meristemático extraído desde el plato basal del bulbillo de ajo. Debido a que el tejido puede deshidratarse rápidamente, esta técnica requiere de la habilidad de un especialista. La extracción del domo meristemático se realizó después del periodo de dormancia, cuando el bulbillo está pronto a su brotación. Es importante destacar que, una de las razones que se postulan para explicar la condición libre de virus del tejido meristemático es debido a que la velocidad de replicación y movimiento de partículas virales es inferior a la tasa de multiplicación celular de este tejido.

En la **Figura 1**, se esquematiza el proceso de saneamiento a partir de un bulbillo de ajo hasta la generación de una planta. En dicha figura, se pueden observar 10 etapas del proceso representadas, cada una de ellas, en un recuadro. Cabe destacar que dos de estas diez etapas corresponden a análisis virológicos (NC-ELISA y RT-PCR), pues con las técnicas de saneamiento no se obtiene un 100% de individuos libres de virus, por lo que es necesario corroborar esta condición. La eficiencia del proceso de saneamiento mejora mientras menor es el tamaño del explante extraído (0.5 mm a 0.2 mm de diámetro), es decir extraer y cultivar sólo el domo meristemático sin primordios foliares.



**Figura 1.** Esquema del proceso de generación de una planta de ajo libre de virus desde el cultivo *in vitro* hasta su aclimatación en invernadero y verificación de su condición libre de virus. En la figura, las flechas color púrpura indican direccionalidad.

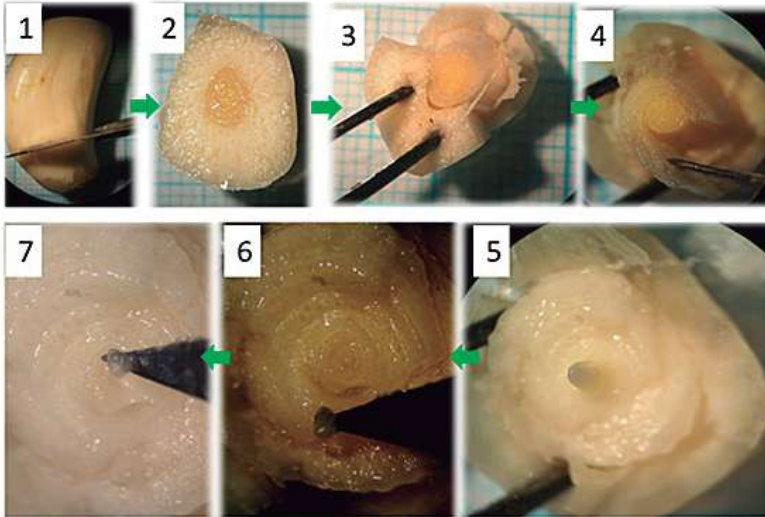
### 3.2.1 Etapas del proceso de saneamiento

#### a) Material vegetal

Se utilizaron bulbos de ajo chino y rosado cultivados y cosechados en predios de agricultores de la región de O'Higgins que son beneficiarios del proyecto. Los bulbos fueron curados, desmochados y posteriormente almacenados en bodega durante 5 meses (enero a mayo), a temperatura ambiente. Previo al proceso de saneamiento, se realizó un análisis virológico a las plantas de ajo cultivadas por los agricultores proveedores de los bulbos. Esto permitió identificar los virus que estaban presentes en el material vegetal (ver Capítulo 2).

#### b) Extracción y cultivo de meristemo

La preparación del explante se inició liberando los bulbillos de ajo de sus catáfilas protectoras, para luego lavarlos durante 20 minutos con una solución de agua y detergente. Posteriormente, el plato basal de los bulbillos fue sometido a un proceso de desinfección con etanol 70° durante 30 seg, seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 50% durante 15 minutos. Finalizada esta etapa, los platos basales fueron llevados a condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar, en donde se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, luego se eliminó cuidadosamente cada catáfila de reserva, incluyendo los primordios foliares que rodean el meristemo (**Figura 2**). Este proceso se llevó a cabo con ayuda de una lupa estereoscópica con aumento de 45 X, bisturí y aguja de disección. El meristemo extraído fue sembrado en un frasco tipo snap con 30 ml de medio de cultivo A1 (M&S con vitaminas, Myo-inositol 0,01%, sacarosa 3%, agar 0,8% y carbón activado 1 grl-1). Los explantes se mantuvieron en condiciones de oscuridad a  $19\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 30 días, para favorecer la elongación del meristemo y formación de una plántula. Posteriormente, fueron expuestos a un fotoperiodo 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad durante 30 días, manteniendo la temperatura de  $19\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Al finalizar este periodo, se realizó un análisis virológico (ver punto 3.3), para determinar la condición libre de virus. Solo las plántulas con dicha condición pasaron a la siguiente etapa que es la multiplicación. La eficiencia de esta etapa del saneamiento de virus en ajo fue en promedio de un 87%.



**Figura 2.** Proceso de extracción de meristemo de bulbillos de ajo. La figura corresponde a un grupo de 7 fotos. La secuencia de ejecución del proceso que representan, está indicado por la dirección de las flechas de color verde: 1: extracción del plato basal, 2: plato basal desinfectado, 3 y 4: eliminación de las catáfilas de reserva, 5: meristemo cubierto por primordios foliares, 6: eliminación de primordios foliares, 7: extracción del domo meristemático. (Fotografías, Bastian Araya B.)

### c) Multiplicación

El proceso de multiplicación se llevó a cabo en cámara de crecimiento con fotoperiodo 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad, a una temperatura de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ . El proceso consideró 3 ciclos de 45 días. Al finalizar cada ciclo se renovó el medio de cultivo y se individualizaron los hijuelos.

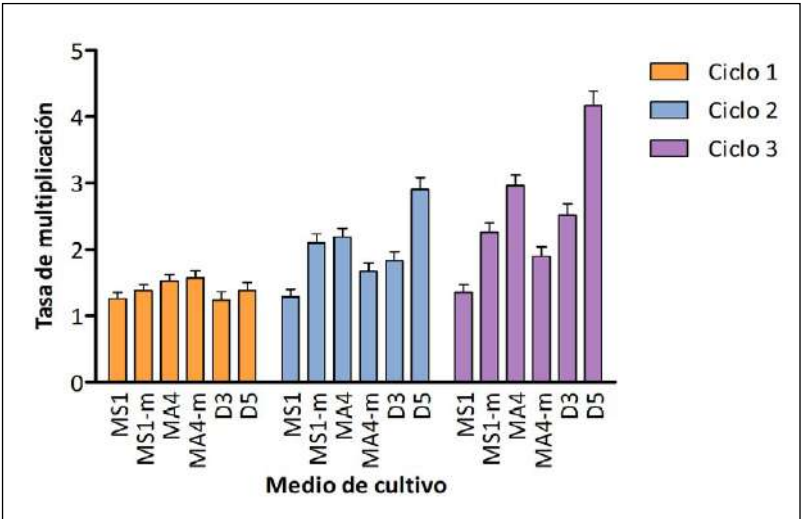
El medio de cultivo utilizado para la multiplicación de los explantes fue determinado mediante un ensayo de evaluación, con un diseño experimental en bloques al azar en el que se consideraron 6 tratamientos y 100 repeticiones por tratamiento. La composición de los medios de cultivo que conformaron cada tratamiento fue variada en macronutrientes y hormonas, según **Cuadro 1**. Todos los medios de cultivo se mantuvieron sin alterar los micronutrientes, sales, y vitaminas de Murashige & Skoog, y se les agregó Myoinositol 0,1gr/L, Sacarosa 30 gr/L, Agar 8gr/L, a un pH 5,7.

La tasa de multiplicación fue calculada después de cada ciclo, y los datos fueron sometidos a un análisis estadístico, utilizando el software Infostat, en el que se aplicó un modelo generalizado mixto para conteo no acotado (Poisson), utilizando enlace log.

Los resultados indicaron que en el primer ciclo de cultivo no hubo multiplicación con ninguno de los medios, mientras que en el segundo ciclo se observaron diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo, en donde las plántulas cultivadas en el medio D5 mostraron una Media de 2,9 hijuelos. Finalmente, luego del tercer ciclo se obtuvo una Media de 4,17 individuos por meristemo extraído al utilizar el medio de cultivo D5. Cabe destacar que la tasa de multiplicación es variable de un explante a otro, por lo que se pudo observar una variación que se movió entre explantes que no generaron hijuelos y explantes que generaron 26 hijuelos al final de los 3 ciclos de cultivo (Figura 3).

**Cuadro 1.** Concentración de macronutrientes y hormonas utilizadas en los 6 tratamientos del ensayo de evaluación de medio de cultivo para multiplicación.

| Tratamiento | Nombre del medio de cultivo | Macronutrientes           | Hormonas                 |
|-------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1           | MS1                         | Murashige and Skoog       | BA 0,4 mg/L              |
| 2           | MS1-m                       | Murashige and Skoog, 1962 | 2 iP 1mg/L               |
| 3           | MA4                         | Gamborg et al., 1968      | ANA 0,2mg/L, 2iP 1mg/L   |
| 4           | MA4-m                       | Gamborg et al., 1968      | 2 iP 1mg/L               |
| 5           | D3 (Moriconi et al., 1990)  | Murashige and Skoog       | ANA 0,1mg/L, 2iP 0,5mg/L |
| 6           | D5 (Moriconi et al., 1990)  | Murashige and Skoog       | ANA 0,3 mg/L, 2iP 3mg/L  |



**Figura 3:** Tasa de multiplicación de plántulas de ajo en tres ciclos de cultivo con 6 medios diferentes.

#### **d) Vigorización y microbulbificación de plántulas**

Una vez cumplido los 3 ciclos de multiplicación, cada plántula fue vigorizada durante 45 días en medio de cultivo MS1-E, el cual es específico para este proceso. Este medio no contiene reguladores de crecimiento y considera las sales basales y vitaminas de Murashige & Skoog, Myoinositol 0,1gr/L, Sacarosa 30 gr/L, Agar 8gr/L, a un pH 5,7. Durante el proceso de vigorización, las plantas mostraron un claro desarrollo foliar, lo que demuestra que están preparadas para iniciar el proceso de microbulbificación.

El desarrollo de microbulbos se llevó a cabo en medio de cultivo MS1-MB, en ausencia de reguladores de crecimiento y conteniendo la sales basales y vitaminas de Murashige & Skoog, Myoinositol 0,1gr/L, Sacarosa 75 gr/L, Agar 8gr/L, con un pH 5,7. Las plántulas vigorizadas se incubaron en cámara de crecimiento durante 45 días con fotoperiodo de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad a 25°C. Al finalizar este periodo se observó en cada planta, la presencia de raíces y de un microbulbo.

#### **e) Aclimatación de plántulas libres de virus**

Las plántulas de ajo microbulbificadas fueron aclimatadas a condiciones de invernadero, lo que se realizó en macetas de 1 litro, que contenían una mezcla estéril de tierra de hoja, turba y perlita en proporciones 2:2:1. Las plántulas se mantuvieron cubiertas durante una semana para mantener el 100% de humedad, y posteriormente se aclimataron gradualmente a la humedad ambiental del invernadero. El proceso de aclimatación se mantuvo por 4 meses, tiempo durante el cual las plantas adquirieron el desarrollo radicular y vegetativo suficiente para adecuarse a condiciones de campo. En este proceso las pérdida de plantas fue inferior al 5%.

Una vez concluido el proceso, las plantas aclimatadas fueron establecidas en condiciones de campo bajo un sistema de exclusión con malla anti-áfidos y doble puerta. Estas plantas constituyeron una maternidad de diente-semilla de ajo, la cual fue monitoreada durante toda la temporada de cultivo utilizando trampas cromáticas para detectar la presencia de áfidos vectores de virus.

Antes de cosecha se realizó un tercer análisis virológico para verificar la condición libre de virus (ver punto 3.3). El resultado de este análisis indicó que no hubo reinfección de plantas.

### 3.3 Análisis virológicos

Como se indicó anteriormente, en este mismo capítulo, el cultivo de meristemo no tiene una eficiencia del 100% al momento de generar plantas libres de virus, por lo que es de vital importancia realizar pruebas virológicas en varias etapas del proceso. Es por este motivo que las plántulas generadas fueron sometidas a 3 análisis virológicos en diferentes etapas de su desarrollo. El primer análisis se realizó mediante la prueba de laboratorio NC-ELISA (Nitrocellulose-Enzyme-Linked Immuno sorbent assay), en el que se utilizó el anticuerpo IPAVE-CIAP-INTA (gentileza de Vilma Conci, INTA Córdoba, Argentina), que determina la presencia del virus del enanismo amarillo de la cebolla, principal causante de pérdidas en la calidad del ajo. Esta prueba fue aplicada al finalizar la etapa de regeneración de meristemo, por lo tanto, en la etapa de multiplicación se continuó sólo con plántulas libres de este virus. El porcentaje de infección con OYD en las plántulas de ajo provenientes de meristemo fue de 51%.

El segundo análisis se realizó mediante la técnica RT-PCR (Transcripción Reversa seguido de la Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando partidores específicos para determinar el virus del enanismo de la cebolla, el virus común latente del ajo y el virus del estriado amarillo del puerro y otros partidores universales que determinan la presencia de especies virales pertenecientes al género *Allxivirus*. Esta prueba se aplicó durante la etapa de aclimatación en invernadero y se encontró un 17% de plantas infectadas, las cuales fueron eliminadas. Por lo tanto, se continuó trabajando con plantas libres de virus, las que posteriormente fueron establecidas encampo en las maternidades de ajo.

Finalmente, para los análisis realizados en la tercera etapa, se utilizó la prueba de laboratorio ELISA-DAS (Enzyme-Linked Immuno sorbent assay Double antibody sandwich). Esta prueba fue aplicada a las plantas establecidas en las maternidades, en época cercana a cosecha. Los resultados mostraron que el sistema de exclusión es eficiente para evitar la reinfección de las plantas mediante vectores, ya que no se determinaron plantas infectadas.

### 3.4 Efecto de los virus en la calidad del bulbo de ajo

Como ya se mencionó, alguno de los virus que infectan el cultivo de ajo generan importantes pérdidas económicas, debido a que son capaces de afectar negativamente el tamaño del bulbo y su peso hasta en un 60% (Lot y cols., 1998; Conci, V. C. y cols.,

2003; Cafrune, E. E. y cols., 2006; Lunello, P. y cols., 2007; Pérez-Moreno L y cols., 2010; Perotto y cols., 2010; Pérez-Moreno, L. y cols., 2013.). Así, las plantas libres de estos fitopatógenos, son capaces de expresar su máximo potencial y, por lo tanto, un cultivo con esta característica genera mayores rendimientos que un cultivo en base a plantas infectadas. No obstante, la producción de plantas de ajo generadas mediante el cultivo de meristemo es un proceso lento, ya que requiere de varios ciclos productivos para lograr la estabilización del cultivo (Conci., 2017. Comunicación personal).

A través del desarrollo de este proyecto, se pudo demostrar que los bulbos de ajo chino provenientes de plantas libres de virus crecidas en campo bajo malla anti-áfidos mostraron, después del primer ciclo productivo, calidad comercial, pues al evaluar el diámetro ecuatorial del total del material cosechado, el 42% de los bulbos alcanzó calidad extra-flor, el 28% calidad flor, el 18% calidad primera y el 12% calidad segunda (**Figura 4**). No se encontraron bulbos con diámetro ecuatorial tal, que permitiera clasificarlos en tercera categoría o como desecho.

Por otro lado, al evaluar 50 bulbos escogidos al azar, se obtuvo un peso promedio de 90 gramos, mientras que el promedio del número de bulbillos por cada bulbo analizado fue de 10.

En el caso del ajo tipo rosado, los bulbos cosechados después del primer ciclo productivo no mostraron calidad comercial, ya que el 85% de ellos no aplicó en ninguna categoría de exportación y el peso promedio fue de 19 gramos con un número promedio de bulbillos por bulbo de 6. Esta situación fue revertida en el segundo ciclo productivo como se muestra más adelante en este capítulo.



**Figura 4.** Categorías comerciales de ajo chino libre de virus obtenidos después de su primer ciclo productivo post-cultivo de meristemo.



Los bulbillos o dientes de ajo chino y rosado cosechados en el primer ciclo de cultivo, fueron nuevamente plantados bajo malla anti-áfido y fueron manejados agronómicamente de la misma forma que los cultivos comerciales de la región (Figura 5).



Figura 5. Plantas de ajo libres de virus en el segundo ciclo de cultivo.

Los dientes semillas de ajo chino obtenidos en el primer ciclo de cultivo alcanzaron a cubrir una superficie de 114 m<sup>2</sup> que fue establecida en el mes de marzo. Al finalizar la temporada de cultivo, en noviembre y después del proceso de curado de la cosecha, se estimó el rendimiento el que alcanzó un valor de 24.193 kilos/hectárea, con un peso promedio de los bulbos de ajo cosechados de 90,42 grs. Al comparar estos resultados con información obtenida de los agricultores productores de ajo de la región de O'Higgins, se puede estimar un aumento de un 34,4% en el rendimiento del cultivo cuando se utiliza semilla de ajo chino libre de virus (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diferencia del peso promedio del bulbo de ajo y rendimiento entre un cultivo de ajo tipo rosado libre de virus y el cultivo de ajo rosado de los agricultores de la región de O'Higgins.

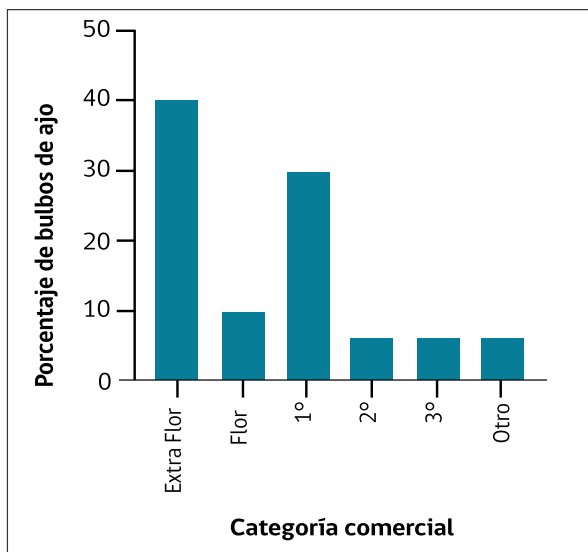
| Procedencia del ajo     | Peso promedio del bulbo en gramos (%) | Rendimiento en Kilos por hectárea (%) |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Cultivo libre de virus  | 90,42                                 | 24.193                                |
| Cultivo de agricultores | 58,33                                 | 18.000                                |
| Diferencia              | 32,09 grs (55,0%)                     | 6.193 kilos/ha (34,4%)                |

En el caso del ajo tipo rosado, los bulbillos de ajo obtenidos en el primer año de cultivo permitieron establecer una superficie plantada de 80 m<sup>2</sup>, la que fue plantada en el mes de abril. Al finalizar la temporada de cultivo en el mes de diciembre y después del proceso de curado de la cosecha, se estimó un rendimiento en 10.500 kilos/hectárea con un peso promedio del bulbo de 35 grs. Al comparar estos resultados con información obtenida de los agricultores de la región, se puede estimar un aumento de un 31% en el rendimiento del cultivo cuando se utiliza semilla de ajo rosado libre de virus (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Diferencia del peso promedio del bulbo de ajo y rendimiento entre un cultivo de ajo tipo rosado libre de virus y el cultivo de ajo rosado de los agricultores de la región de O'Higgins.

| Procedencia del ajo     | Peso promedio del bulbo en gramos (%) | Rendimiento en Kilos por hectárea (%) |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Cultivo libre de virus  | 35                                    | 10.500                                |
| Cultivo de agricultores | 26,6                                  | 8.000                                 |
| Diferencia              | 8,4 (32%)                             | 2.500 (31%)                           |

En este segundo ciclo de cultivo del ajo rosado libre de virus, se pudo observar bulbos con calidad comercial. En donde el 40% de la producción fue calidad extra-flor y tan sólo el 6,7% de la producción no aplicó para los estándares de exportación (**Figura 6**).



**Figura 6.** Porcentaje de bulbos de ajo rosado libres de virus por categoría comercial.

### 3.5 Conclusiones

Este proyecto permitió generar una plataforma de producción de plantas de ajo libres de los virus que comúnmente afectan el cultivo de la región de O'Higgins. De esta manera, los procesos de cultivo de meristemo, multiplicación y bulbificación *in vitro* permitieron llevar a campo las primeras plantas de ajo libres de virus producidas en la región, las que posteriormente generaron una maternidad de diente-semilla libres de virus, que será la base para iniciar una producción a escala comercial.

El proyecto permitió demostrar que los rendimientos de ajo chino aumentan en un 34,4% y los de ajo rosado un 31%, cuando el cultivo se realiza con diente-semilla de ajo libre de virus. Así mismo, el aumento de los estándares de calidad del cultivo, se vio también reflejado en ambos tipos de ajo debido a que se obtuvo mayor porcentaje de bulbos en categorías comerciales aptas para los requerimientos de los mercados internacionales.

### 3.6 Bibliografía

- Cafrune, E. E., Perotto, M. C., & Conci, V. C. (2006). Effect of Two Alexi virus Isolates on Garlic Yield. *Plant Disease*, 90(7), 898-904. <https://doi.org/10.1094/pd-90-0898>.
- Conci, V. C., Canavelli, A., Lunello, P., Di Rienzo, J., Nome, S. F., Zumelzu, G., & Italia, R. (2003). Yield Losses Associated with Virus-Infected Garlic Plants During Five Successive Years. *Plant Disease*, 87(12), 1411-1415. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.12.1411>.
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., & Delecalle, B. (1998). Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Viruses on Symptomatology and Yield Loss of Three French Garlic Cultivars. *Plant Disease*, 82(12), 1381-1385. <https://doi.org/10.1094/pdis.1998.82.12.1381>.
- Lunello, P., Di Rienzo, J., & Conci, V. C. (2007). Yield Loss in Garlic Caused by Leek yellow stripe virus Argentinean Isolate. *Plant Disease*, 91(2), 153-158. <https://doi.org/10.1094/pdis-91-2-0153>.
- Pérez Moreno, L., Navarro León, M., Ramírez Malagón, R., Mendoza Celedón, B., Núñez Palenius, H., & León Galván, M. F. de. (2013). Pérdidas en rendimiento y calidad de compuestos seleccionados de ajo causadas por infecciones naturales de mezcla de virus. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 38(5), 370-376. Recuperado de <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/12/370-c-PEREZ-MORENO2-7.pdf>.