

MINISTERIO DE AGRICULTURA



Instituto Nacional de Innovación Agraria



**TÉCNICA DE PRODUCCIÓN
DE SEMILLA GENÉTICA Y BÁSICA
DE AJO (*Allium sativum* L.)
LIBRE DE VIRUS**

MINISTERIO DE AGRICULTURA

INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - INIA

Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral

Programa Nacional de Investigación en Hortalizas

**TÉCNICA DE PRODUCCIÓN
DE SEMILLA GENÉTICA Y BÁSICA
DE AJO (*Allium sativum* L.)
LIBRE DE VIRUS**

Ing. M.Sc. Julio Olivera Soto

© INSTITUTO NACIONAL DE INNOVACIÓN AGRARIA - INIA

DIRECCIÓN DE EXTENSIÓN AGRARIA

Diagramación e Impresión:

Unidad de Medios y Comunicación Técnica

Primera Edición:

Agosto, 2009

Tiraje : 500 ejemplares

Av. La Molina N° 1981, Lima 12 Casilla N° 2791 - Lima 1

Telefax: 3495631 / 3492600 - Anexo 248

Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N°: 2009-10873

PRESENTACIÓN

*Como parte de las actividades de investigación del Programa Nacional de Investigación en Hortalizas (PNI-H), está considerada la generación de tecnologías varietales y de manejo, por ello a través del Subproyecto Tecnología de Producción de Semilla, se llevó a cabo el experimento de producción de semilla genética de ajo, empleándose técnicas de producción de semilla como la termoterapia y la micropropagación en el proceso de obtención de plantas libres de virus en ajo. La presente publicación describe la técnica de producción de semilla genética y básica de ajo (*Allium sativum* L.) libre de virus la cual permite incrementar el rendimiento de 8,0 t/ha a 25,0 t/ha (rendimiento potencial).*

Coordinación del
Programa Nacional de Investigación en Hortalizas.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	7
2. VIROSIS DEL AJO	8
3. TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE CALIDAD DE AJO	10
3.1 Tratamiento de termoterapia	10
3.2 Desinfección del explante	11
3.3 Medio de cultivo	12
3.4 Fase de inicio	16
3.5 Fase de multiplicación	17
3.6 Bulbificación (formación de microbulbillos)	18
3.7 Obtención de minibulbillos	19
4. BIBLIOGRAFÍA	22

1. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L), es una especie de reproducción agámica, este tipo de reproducción vegetativa ocasiona que las enfermedades que lo afectan se transmitan de generación en generación a través de los bulbos.

En nuestro país se siembran alrededor de 8 000 hectáreas de ajo, tanto de los ajos blancos como de los morados. Las principales zonas productoras del país son Arequipa, Cajamarca y Lima. El rendimiento promedio a nivel nacional es de 8,0 t/ha (Oficina de Información Agraria, OIA - MINAG), el cual es bajo teniendo en cuenta que el potencial llega hasta las 25 t/ha.

El bajo rendimiento se debe principalmente a la mala calidad de semilla que usan los agricultores, provenientes de sus propios campos o de mercados locales, debido a que estos bulbos usados como semilla cada campaña transmiten enfermedades causadas por virus, hongos y nemátodos.

El uso de semilla de ajo libre de virus permite incrementar considerablemente el rendimiento, hasta en un 100% en campos de producción de agricultores y en 150% en parcelas experimentales. Esto debido a que los bulbos de ajo obtenidos bajo la técnica de producción de semilla genética-básica producen plantas vigorosas, libre de virus y otros patógenos. Para un plan de producción de semilla de ajo es imprescindible el uso de material libre de virus como punto de partida tal que nos permita iniciar la producción de bulbos semilla de ajo para iniciar un plan de producción comercial para exportación o para el intercambio de germoplasma a nivel internacional, que exige el empleo de semilla certificada libre de patógenos.

2. VIROSIS DEL AJO

Son diversos los virus que afectan al ajo y en algunos casos forman un complejo que produce la enfermedad del mosaico del ajo debido a que presentan un mosaico en las hojas y son causantes de la disminución del tamaño de los bulbos y por ende de la disminución del rendimiento. La transmisión de los virus de una planta sana a una enferma se produce por insectos vectores y se propaga por el uso de semilla vegetativa infectada.



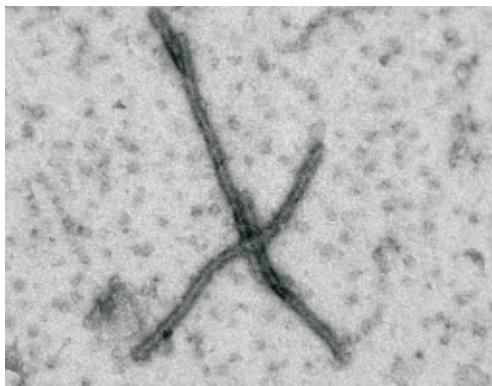
Hojas de ajo sano y ajo con virus

Los virus detectados en ajo y en otras especies de la familia Alliaceae, son transmitidos principalmente por áfidos: tenemos dentro del grupo de los *Potyvirus* al *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) y el *Leek yellow stripe virus* (LYSV) y en el grupo de los *Carlavirus* al *Shallot latent virus* (SLV) y el *Garlic common latent virus* (GCLV) (Conci, 2000), generalmente este grupo de virus causa el “mosaico del ajo”, que presenta síntomas de mosaicos tenues y acentuados, así como rayas cloróticas en las hojas. Aunque a veces no hay coincidencia en la

identificación de los virus que causan el “mosaico del ajo”, con ayuda de técnicas moleculares actualmente se está identificando a nivel mundial los virus que causan esta enfermedad.

La técnica más utilizada para detectar virus en ajo que actualmente se emplea es ELISA (enzyme - linked immunosorbent assay) o técnica inmunoenzimática. Estos test son relativamente de bajo costo y permite analizar muestras en protocolos simples de tejido meristemático o de cualquier otro tejido de interés para detectar la presencia de virus, siempre y cuando se cuente con los antisueros específicos para cada virus.

Los antisueros de alta especificidad se pueden obtener para los virus aislados de un conjunto de virus que afectan este cultivo. Dentro de los *Potyviridae*, el LYSV es uno de los comunes y que con mayor frecuencia se encuentra en los diferentes clones en diferentes latitudes (Salomón, 2002).



Partículas virales de GCLV

3. TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE SEMILLA DE CALIDAD EN AJO

3.1 Tratamiento de termoterapia

La termoterapia es una técnica que se aplica con la micropropagación en los procesos de obtención de plantas libres de virus, no solamente en ajo, sino en otras especies como fresa, camote, caña de azúcar, papa, entre otros.

El tratamiento térmico de los bulbos de ajo detiene el desarrollo de los virus en los tejidos adyacentes al meristema. El tratamiento más recomendable es el que se realiza en una cámara de termoterapia. Inicialmente se coloca los dientes de ajo en sustrato desinfectado en bandejas en la cámara de termoterapia a 36°C–38°C durante 30 a 40 días.

Con estas temperaturas la multiplicación de los virus en las células vegetales se reduce o en algunos casos completamente se detiene, al mismo tiempo las células meristemáticas de la planta continúan dividiéndose e incrementando aunque mas lento. Una de las explicaciones del funcionamiento de esta técnica es la competencia entre las células del huésped que se encuentran en proceso de rápida división y las partículas del virus por lugares de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas lo cual puede llevar a un cambio en el balance entre la síntesis y degradación de las partículas del virus. Otra explicación es que el ácido nucleico del virus, portador de su información genética, está protegido del ataque de enzimas degradantes por una cubierta compuesta de muchas subunidades de proteína. A altas temperaturas, la unión entre estas subunidades se vuelve más débil, se pueden producir aberturas temporales y permitir el ataque de las nucleasas, lo que inactiva al virus y disminuye la concentración del mismo (Panta, Golmirzaie, 1997).

Este tratamiento no elimina completamente los virus en las plantas, pero un gran porcentaje de dientes estarán libres de virus. Depende también de los cultivares que se está tratando, ya que la respuesta no es la misma y en algunos cultivares se puede obtener mayor porcentaje de plantas libres de virus como para el caso del LYSV.



Tratamiento de termoterapia de bulbos de ajo en incubadora

3.2 Desinfección del explante

Después del tratamiento de termoterapia, los dientes se pelan; se cortan tratando de darles una forma rectangular y se lavan con abundante agua de caño y jabón, luego se enjuagan 3 veces con agua destilada. Enseguida se lleva el material a la cámara de flujo laminar, para trabajar en condiciones asépticas y evitar la contaminación. Las yemas se lavan con etanol al 70% durante 30 segundos y a continuación se sumergen en hipoclorito de sodio al 2% durante 12 minutos, para luego enjuagarlas bien con agua destilada esterilizada en autoclave.



Seleccionar, desgranar y pelar los dientes de ajo (remoción de cutícula)



▲ Lavar con agua y jabón.

◀ Eliminar la parte superior de los dientes.

◀ Cortar los dientes en forma rectangular

3.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo a utilizarse puede ser el medio de cultivo LS (Linsmaier y Skoog, 1965) modificado o el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, también el medio MS original funciona en algunos cultivares. En este caso se presenta el medio de cultivo modificado que se utiliza con cultivares de ajo blanco. Los macronutrientes son modificaciones del MS, los micronutrientes son originales del MS y las vitaminas son del medio LS.

Medio de Cultivo para Ajo Murashige & Skoog y Linsmaier & Skoog (LS) Modificados (MMA)

Sales	Fórmula	Concentración mg/l
Nitrato de potasio	KNO_3	5 700,00
Fosfato de amonio	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	150,00
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,00
Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,00
Fosfato de sodio	NaH_2PO_4	255,00
Loduro de potasio	KI	0,83
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
Sulfato cúprico	$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Acido bórico	H_3BO_3	6,20
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
EDTA disódico	Na_2EDTA	37,30
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80
Mio - inositol		100,00
Tiamina		0,4

El pH del medio de cultivo es de 5,6 y se debe medir luego de haber agregado sacarosa al 3%, luego se agrega agar al 0,8% como solidificante. El medio de cultivo preparado se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 1,2 kg/cm². Se dispensa en tubos de prueba para la fase de iniciación y en cajas de polipropileno con tapas mas conocidas como "magentas" o frascos de vidrio para la fase de multiplicación y de enraizamiento, dispensando 40 ml de medio de cultivo por recipiente.

Se preparan soluciones madres o stock de acuerdo a las necesidades del laboratorio y a modo de graficarlo mostramos las siguientes soluciones:

Concentración de las soluciones stock del medio de cultivo MMA

Solución Stock de Macronutrientes:				
mg/l		20X (en g)	Diluir en:	Agregar:
KNO ₃	5 700	114,0	2 litros de agua	100 ml por litro de MS
NH ₄ H ₂ PO ₄	150	3,0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	7,4		
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	8,8		
NaH ₂ PO ₄ *	255	5,1		
Solución Stock de Micronutrientes:				
mg/l		50X (en g)	Diluir en:	Agregar:
KI	0,83	0,0415	250 ml de agua	5 ml por litro de MS
H ₃ BO ₃	6,3	0,315		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	1,115		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	0,43		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,00125		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,00125		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,0125		
Solución Stock de Hierro:				
mg/l		50X (en g)	Diluir en:	Agregar:
Na ₂ EDTA	37,3	1 865	250 ml de agua	5 ml por litro de MS
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	1 390		
Solución Stock de Vitaminas:				
mg/l		50X (en g)	Diluir en:	Agregar:
Mio-inositol	100,0	5,00	250 ml de agua	5 ml por litro de MS
Tiamina	0,1	0,005		

* Se puede preparar por separado el fosfato de sodio para que no se precipite la solución madre.

Los reguladores de crecimiento son fundamentales para inducir el desarrollo de un determinado órgano en la microplanta, estos pueden actuar solos o en combinación, en diferentes concentraciones. La disolución de los reguladores de crecimiento y la concentración μM que se usan en la preparación de los medios de cultivo para fresa y ajo se muestra en el siguiente cuadro:

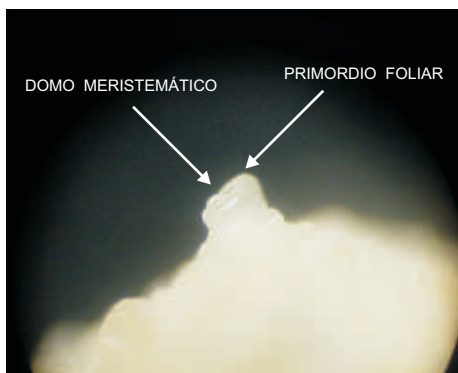
**Reguladores de crecimiento usados en la
micropropagación de ajo (concentración en μM)**

Regulador de crecimiento	Ácido Indol Butírico IBA	Bencil Amino Purina BAP	Ácido Naftaleno Acético ANA	Iso Pentanil Adenina 2IP
Peso molecular	203,2	225,3	186,2	203,2
Disolvente	Etanol 1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
Diluyente	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
T° almacenamiento polvo	2 - 8°C	T.A.	T.A.	0°C
T° almacenamiento líquido	0°C	2 - 8°C	2 - 8°C	0°C
Equivalente a 0,1 ppm	0,49	0,44	0,54	0,49
Equivalente a 0,5 ppm	2,46	2,22	2,69	2,46
Esterilización	CA / F	CA / F	CA	CA / F
Concentración de trabajo (mg/l)	0,1 – 10,0	0,1 – 5,0	0,1 – 10,0	1,0 – 30,0

T.A.: Temperatura de ambiente
CA: Coautoclavable
F: Esterilización por filtración

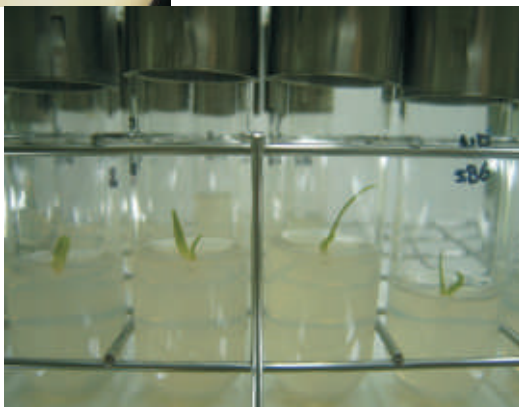
3.4 Fase de inicio

En esta fase se lleva a cabo la disección o corte del meristema. El meristema es el punto de crecimiento activo del brote del diente y está compuesto por el domo meristemático y un primordio foliar. El ajo debe estar con 2/3 de brotación como mínimo para poder utilizar este material para la siembra. Se separan las capas envolventes hasta llegar a los primordios foliares que cubren el domo meristemático. Luego se procede a hacer la disección del meristema (domo meristemático y un primordio foliar envolvente) con ayuda de pinzas y bisturí.



Meristema de ajo visto a través de un microscopio estereoscópico.

Regeneración de microplantas de ajo a partir de meristemas.

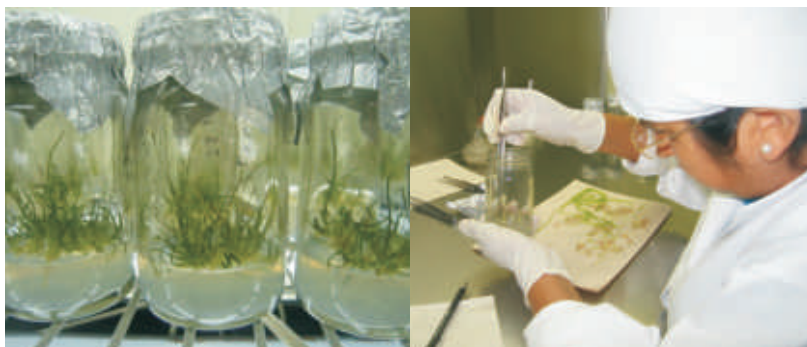


En esta fase el empleo del medio LS ha sido ampliamente usado y la combinación de auxinas y citoquininas induce la formación de brotes adventicios basales (George, 1996). Para la regeneración del tejido meristemático y la formación de las microplantas se adiciona al medio de cultivo MS los reguladores de crecimiento BAP 0,5 mg/l y ANA 0.1 mg/l (Olivera, 1997).

La regeneración del meristema se logra en 8 a 10 semanas dependiendo del cultivar y en ese lapso se llega a formar la microplanta de 5 a 6 cm de longitud.

3.5 Fase de multiplicación

Cuando las microplantas de ajo se han regenerado a partir del meristema se procede a trasplantarlas a un medio de cultivo de multiplicación. Se siembran las microplantas en magentas (cajas de polipropileno) o en frascos de vidrios con tapas de papel aluminio. El medio de cultivo en esta fase es recomendable que sea el medio modificado para ajo (MMA), a diferencia del medio de cultivo para la fase de inicio que es mas adecuado con el MS.



Formación de macollos en microplantas de ajo en medio de cultivo de multiplicación.

División de macollos para incremento y siembra de brotes en nuevo medio de multiplicación.

Se siembra de 4 a 6 brotes por envase, dependiendo de la capacidad del mismo y de la respuesta a los reguladores de crecimiento. Después de la formación de un macollo este a su vez se subdivide para así continuar la propagación.

El regulador de crecimiento que se puede usar en esta fase para el caso de ajo "Arequipeño" y "Napurí" es el 2IP en concentración de 6 a 10 ppm según sea la respuesta de macollamiento de las microplantas, y para el caso de otros cultivares se usa BAP 2,0 ppm en combinación con ANA 2,0 ppm.

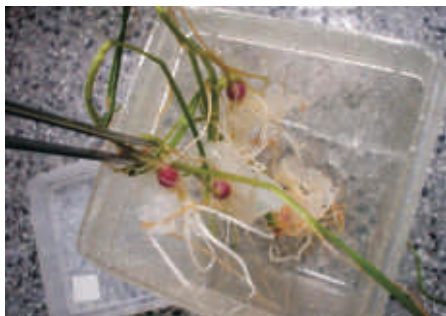
Durante la fase de inicio o la fase de multiplicación se puede presentar un desarrollo anormal de las microplantas que se denomina "vitrificación"; esta anomalía se produce por la excesiva absorción de humedad de los brotes al estar en contacto con el medio de cultivo por causa de separación excesiva de los macollos.

3.6 Bulbificación (formación de microbulbillos)

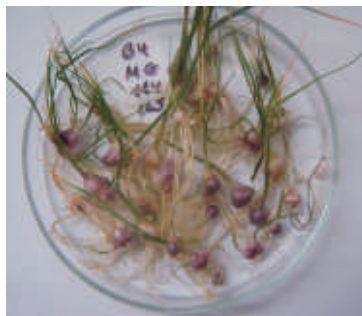
Luego de la fase de multiplicación se separan los brotes y se siembran en medio de cultivo de bulbificación, donde se induce la formación de microbulbillos mediante el estrés osmótico. Para esto es necesario agregar sacarosa en concentraciones elevadas para generar el estrés en la microplanta que van de 8 a 12% según se vea mejor respuesta del cultivar en inducir la formación de los microbulbillos.

Este material obtenido conforma la semilla genética y luego de extraerlo de los envases se deja secar y se almacena en un lugar fresco y ventilado. Inicialmente puede tener raíces y hojas largas al

ser sacados de los frascos o tubos, pero es conveniente eliminarlos cuando se secan, antes del almacenamiento.



Microbulbillos formados 'in vitro' extraídos de sus contenedores.



Secado de microbulbillos en placas Petri en medio ambiente.

3.7 Obtención de minibulbillos

Después que los microbulbillos se producen en laboratorio y culmina el periodo de dormancia, en 3 ó 4 meses promedio, se siembran en bandejas de almácigo con sustrato desinfectado de musgo y perlita, se coloca en invernadero para que broten y se formen las plántulas.



Siembra de microbulbillos de ajo en bandejas de almácigo con sustrato a base de musgo.



Crecimiento de plántulas de ajo en bandejas a partir de microbulbillos.

En condiciones de temperaturas menores de 20°C se desarrollan los minibulbillos; este material se considera la semilla pre-básica (primera generación). Al final del periodo vegetativo los minibulbillos se extraen de las bandejas cuando ya se observa que las hojas se están secando y se dejan secar en espacios sombreados y ventilados.

La siguiente campaña se sembrará este material después del periodo de dormancia en el invernadero en camas bajas para que formen nuevamente una segunda generación de minibulbillos, que será la semilla básica.



◀ Desarrollo de plantas de ajo para formación de minibulbillos.

▶ Cosecha de minibulbillos después de secado de plantas.



Los minibulbillos obtenidos en los invernaderos se consideran semilla básica hasta que alcanzan la madurez fisiológica y desarrollan del tamaño de un bulbo normal de ajo obtenido en campo.



Minibulbillos de ajo primera generación a la izquierda y minibulbillos segunda generación a la derecha después de cosecha y secado.

Después de la cosecha se deja secar y luego se almacena en un ambiente sombreado y fresco a temperatura de medio ambiente, de preferencia en bolsas de papel para evitar el daño por lepidópteros.

Luego de pasado el periodo de dormancia de 5 meses promedio ya se puede instalar en campo para producción de semilla.



4. BIBLIOGRAFÍA

1. CONCI, V C; CAFRUNE, E E; LUNELLO P; NOME S; PEROTTO C. 2002. Producción de plantas de ajo libres de virus, En: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA. Argentina. Pag. 313-316.
2. GEORGE, E. F. 1996. Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practice. Ed. Exegetics Ltd. England. Pag. 1187.
3. LINSMAIER, E. M.; SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. V 18. p. 100-127.
4. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. V 15. p. 473-497.
5. OLIVERA S., J. 1997. Producción de ajo libre de enfermedades por cultivo de tejidos. Informe de Experimento Concluido. DGIA - INIA.
6. PANTA, A.; GOLMIRZAI, A. 1997. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos con fines de producción de semilla de papa. En: Producción de Tubérculos - semillas de papa. Manual de Capacitación. CIP. Fasc. 4.2- 97. Pag. 3.

7. SALOMON, R. 2002. Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plants. En: Allium, Crop Science: Recent advances. CABI Publishing. Pag 317.

8. PROGRAMA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN HORTALIZAS 2008. Expediente Técnico del Cultivar de Ajo INIA-104-Blanco Huaralino. Pág. 133.