



# **Efectos de la Termoterapia y el Cultivo in vitro de Meristemas sobre la Presencia del Virus del Enanismo Amarillo de la Cebolla (OYDV) en Ajo (*Allium sativum* L.)**

Antonio Jáquez Santiago, Samira De la Cruz Matos, Luis Matos Casado, Ana Antonia Tapia Merán, Wascar Saldaña, Danilo Osvaldo Soto.

**Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias – Universidad Autónoma de Santo Domingo.**

# Introducción

En Constanza, República Dominicana, el ajo ocupa un lugar muy importante en la agricultura local. Sin embargo, la presencia de virus en este cultivo ha tenido un efecto notable tanto en la productividad como en la calidad de este.

La aplicación de la termoterapia y el cultivo in vitro de meristemos se han convertido en técnicas fundamentales en la agricultura para el control y la erradicación de virus en plantas.



**Figura 1.** Bulbos de ajo Morados colectados en Constanza, RD

Este cultivo se ha concentrado principalmente en la zona de Constanza, pero la cantidad cultivada no es suficiente para satisfacer el mercado local. A pesar del aumento en el consumo de ajo en la República Dominicana, solo el 10% del ajo demandado se produce en las zonas de producción.

En el país se consumen entre 180,000 y 200,000 quintales de ajo al año, pero solo se produjeron 18,000 quintales, es decir, apenas el 10% (Caraballo, 2017).



**Figura 2.** Predio en el momento en que se cosecha ajo, en Constanza, La Vega, República Dominicana.



# Justificación

1. La justificación de este proyecto biotecnológico radica en la **necesidad** urgente de abordar las enfermedades virales que afectan al ajo **cultivado en Constanza**, utilizando enfoques científicos y tecnológicos avanzados.
2. La **micropropagación** y las **técnicas de limpieza** viral representan métodos efectivos para la producción de ajo libre de virus, lo que redundará en beneficios económicos, sociales y medioambientales.
3. Para la **implementación exitosa del proyecto exhortamos** luego del mismo, de la **colaboración** entre investigadores, técnicos y agricultores, y su impacto positivo será **un modelo** para el manejo de enfermedades virales en este y otros cultivos importantes.
4. Desde un punto de vista social, el proyecto contribuirá a la **sostenibilidad de la agricultura local**, promoviendo prácticas agrícolas más sanas y seguras.



# Objetivos de la Investigación

- Objetivo general de la investigación.

Evaluar el efecto de la termoterapia y el cultivo *in vitro* de meristemo en la eliminación del virus (*OYDV*) en los clones de ajo Katín y Morado cultivados en Constanza.

- Objetivos específicos.

- 1) Determinar la temperatura óptima para la aplicación de la termoterapia.
- 2) Evaluar la efectividad del uso combinado de la termoterapia y el cultivo *in vitro* de meristemo en la eliminación de virus en los clones de ajo Katín y Morado.
- 3) Determinar la concentración hormonal óptima para el establecimiento *in vitro* de ajos de los clones Katín y Morado.
- 4) Determinar la concentración hormonal óptima para la obtención de microbulbillos de ajos de los clones Katín y Morado.



# Marco Teórico

- Resumen de la literatura relevante.

En el trabajo de investigación “**TERMOTERAPIA Y CULTIVO IN VITRO DE AJO (*ALLIUM SATIVUM L.*) PARA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA CEBOLLA**” se confirma que las técnicas combinadas influyeron favorablemente en la eliminación del potyvirus *OYDV*.

En contraposición, la aseveración hecha en el trabajo “*Combination of stem-disc dome culture and thermotherapy to eliminate Alexiviruses and OYDV from garlic (Allium sativum cv. Hamedan)* pudiera corroborar los resultados nuestros en relación a la termoterapia ya que en este trabajo se establece que: *Aunque la termoterapia combinada con el cultivo de meristemas elimina con éxito los (GarVs), también inhiben específicamente la eliminación de OYDV. La eficacia de la termoterapia también depende del tipo viral y la condición de esta. Shibolet et al. (2001) informó que la termoterapia administrada al ajo mejora la eliminación del virus del baneado del puerro (LYSV), virus latente común del ajo (GarCLV) y Alexivirus, pero inhibieron la eliminación del OYDV.*

En el trabajo antes citado se usaron dos temperaturas, severa en el día y suave en las noches, esto para la supervivencia de las plantas. La inhibición de la eliminación de *OYDV* puede resultar de un tratamiento con temperatura suave durante la noche.

Lo que pudiera coincidir con nuestro trabajo, como mostraremos más adelante.



# Metodología

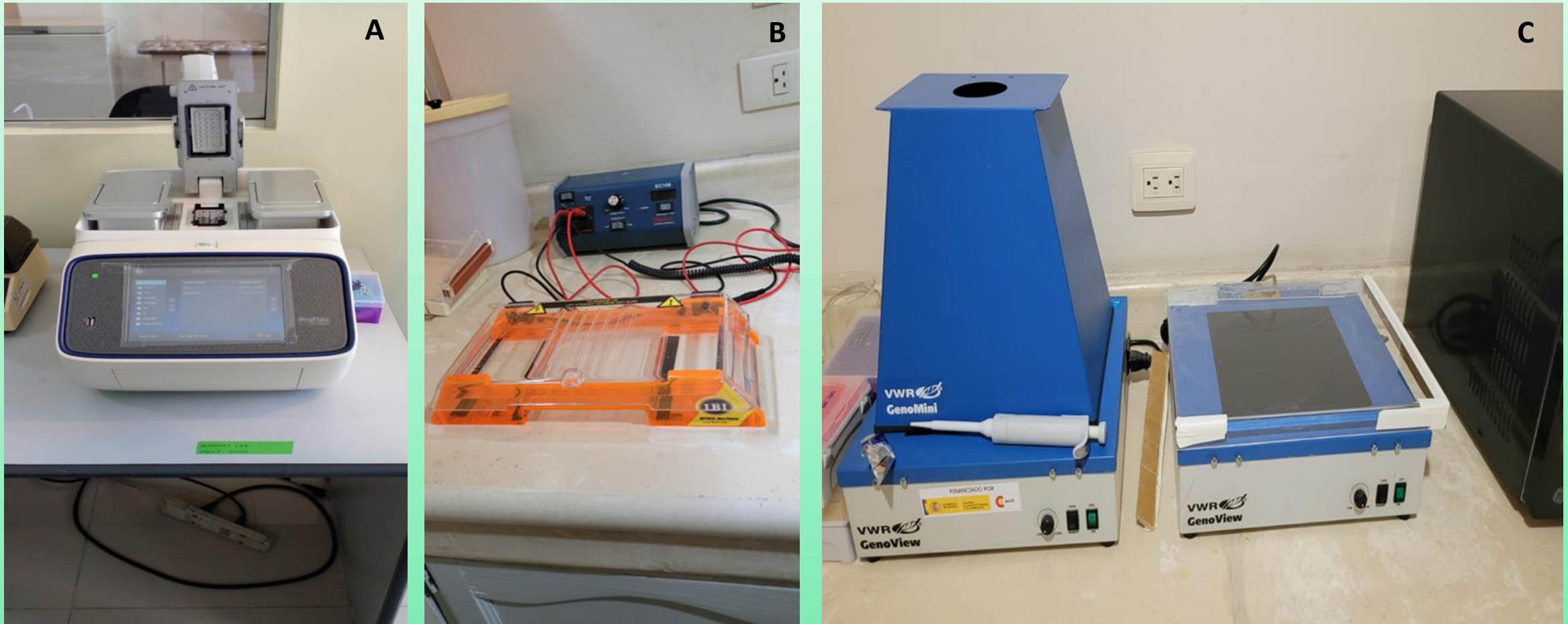
El material colectado fue trabajado en los laboratorios Iván Guzmán Klang, de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias.



**Figura 4.** Laboratorios Iván Guzmán Klang, Facultad de Cs. Agronómicas y Veterinarias, UASD. |

## Descripción de los métodos de Investigación utilizados.

Las muestras se analizaron en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad donde se sometieron a pruebas para la detección de virus empleando la técnica (**RT-PCR**).



**Figura 5. A) Termociclador PCR ProFlex. B) Sistema de Electroforesis IBI Horizontal. C) Transiluminador ultravioleta**



Para sanear el material previamente diagnosticado con virus, dicho material fue llevado al laboratorio de Biotecnología.

En una primera etapa se introdujo el material en una incubadora **Thermo Scientific HaraTherm** durante 30 días a temperaturas de **36°C, 38°C y 40°C**.



Figura 6. A) Ajo del Clon Catín.

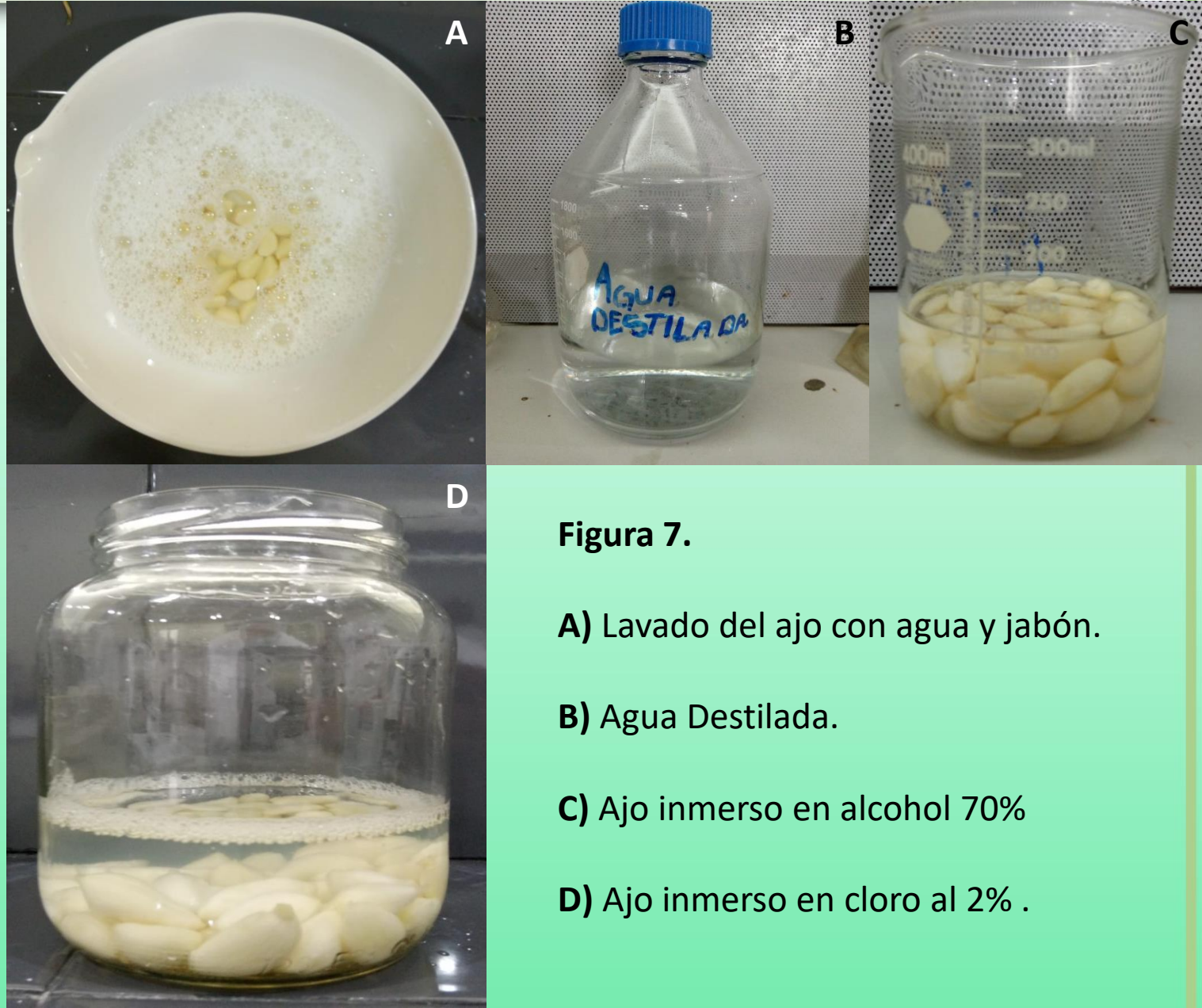


B) Ajo del Clon Morado.



C) Laboratorio de Biotecnología

1. Los bulbillos se **lavar**on con abundante agua y jabón.
2. Se enjuagaron tres veces con **agua destilada** esterilizada.
3. Se llevó el material a la cabina de flujo laminar para trabajar en condiciones asépticas.
4. Las yemas se introdujeron en **alcohol al 70%** por 30 segundos.
5. Se sumergieron el **cloro** comercial al **20%** por **doce (12) minuto**.
6. Se descartó la solución y se enjuagó tres veces con agua destilada esterilizada.



**Figura 7.**

- A)** Lavado del ajo con agua y jabón.
- B)** Agua Destilada.
- C)** Ajo inmerso en alcohol 70%
- D)** Ajo inmerso en cloro al 2% .

▪ **Etapa de establecimiento (30d)**

MS sin reguladores

MS + 0.6 AIB

MS + 0.2 ANA + 2.3 BAP

▪ **Etapa de Microbulbos (45 d)**

MS + 2 2ip + 0.5 ANA

MS + 2 BAP + 0.1 ANA

MS + 0.5 2ip + 0.25 ANA

MS + 2 2ip + 80 SA + 0.5 ANA

MS + 5 2ip + 0.1 ANA



**Figura 8 .A)** Cultivo in vitro. **B)** Distribución de medios.



## Etapa de Establecimiento



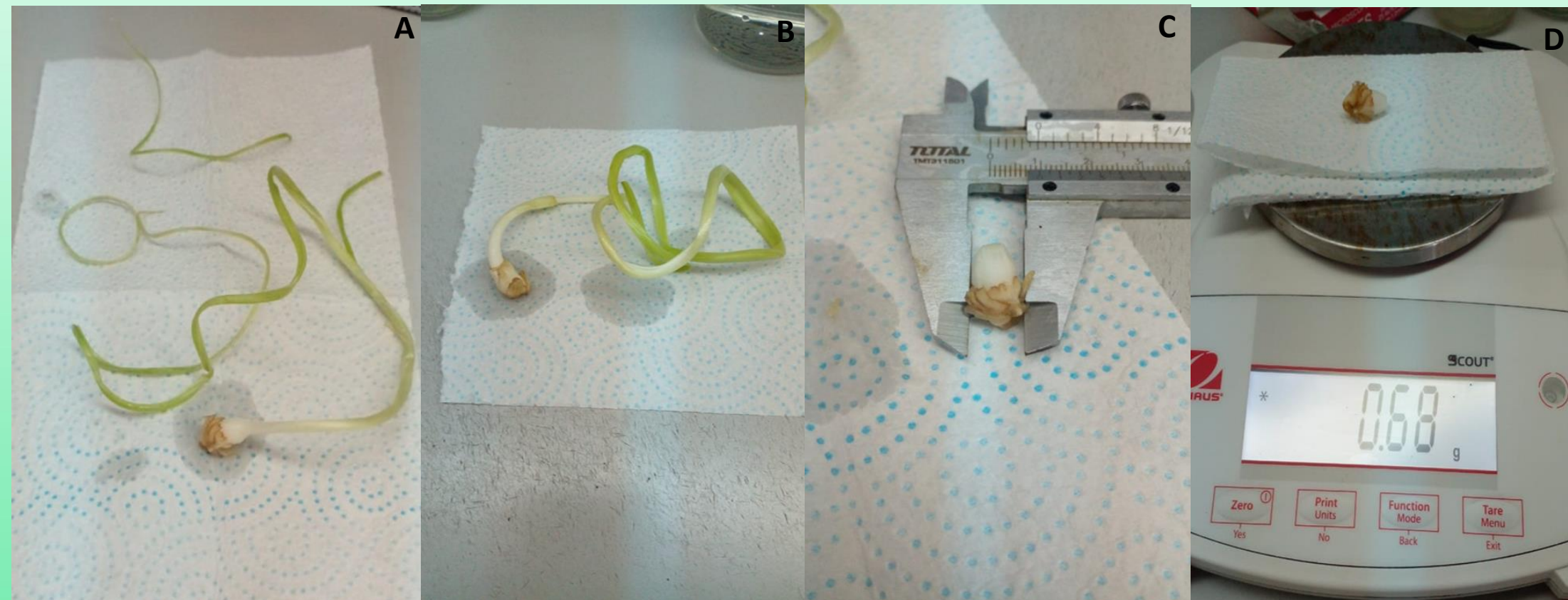
**Figura 9.** Toma de medidas (cm) de las vitroplantas después de 30 días de la simbra de establecimiento.

## Etapa de Formación de Microbulbos

Tras la etapa de establecimiento las vitroplantas fueron sembradas para el desarrollo de Microbulbos.

### Variables evaluadas

A los 45 días de cultivo se midió el diámetro del micro bulbo con un pie de rey y el peso del microbulbo con una balanza.



**Figura 10.**  
A y B) Vitroplantas luego de 45 días. C) Toma de diámetro con pie de rey. D) Peso usando balanza.



# Resultados

- Descripción de los resultados de investigación.

**Tabla 1:** Porcentaje (%) de supervivencia a termoterapia de las muestras

Temperatura	Muestras Incubadas	Supervivencia	% de Supervivencia
36°C.	22	22	100%
38°C.	20	20	100%
40°C.	31	05	16.12%





Tabla 2: Análisis ANOVA, etapa de establecimiento ajo Clon Morado.

	A	B	C	D	E	F	G
1	<b>Etapa de Establecimiento Ajo Morado</b>						
2	<b>ANOVA</b>						
3			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
4	<b>Raices</b>	Entre grupos	3.358	2	1.679	0.864	0.424
5		Dentro de grupos	262.359	135	1.943		
6		Total	265.717	137			
7	<b>Longitud (cm)</b>	Entre grupos	829.413	2	414.706	6.426	0.002
8		Dentro de grupos	8712.722	135	64.539		
9		Total	9542.135	137			



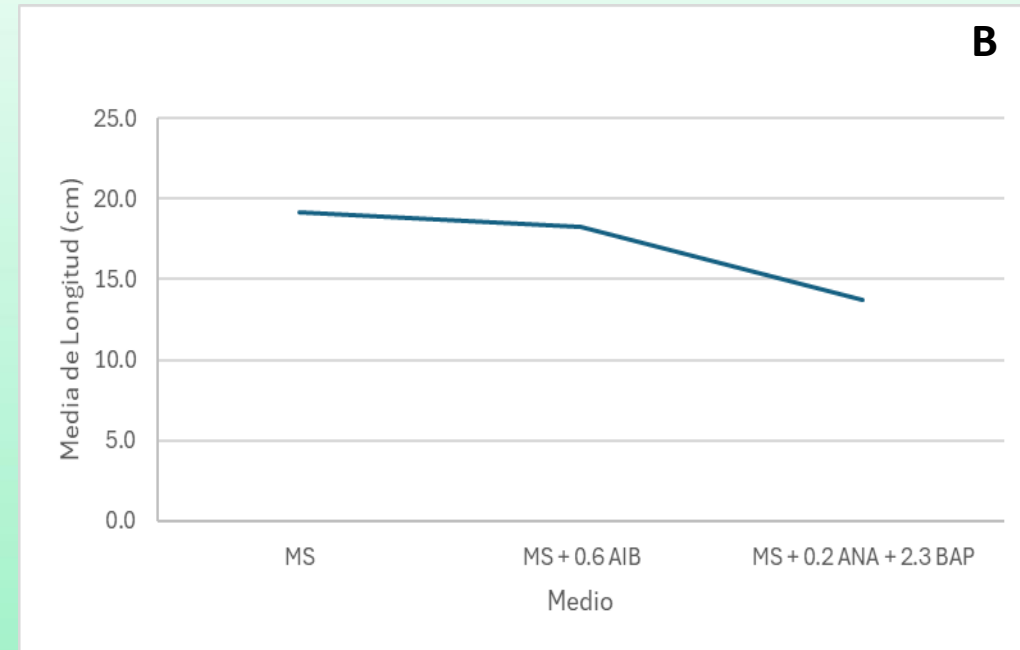
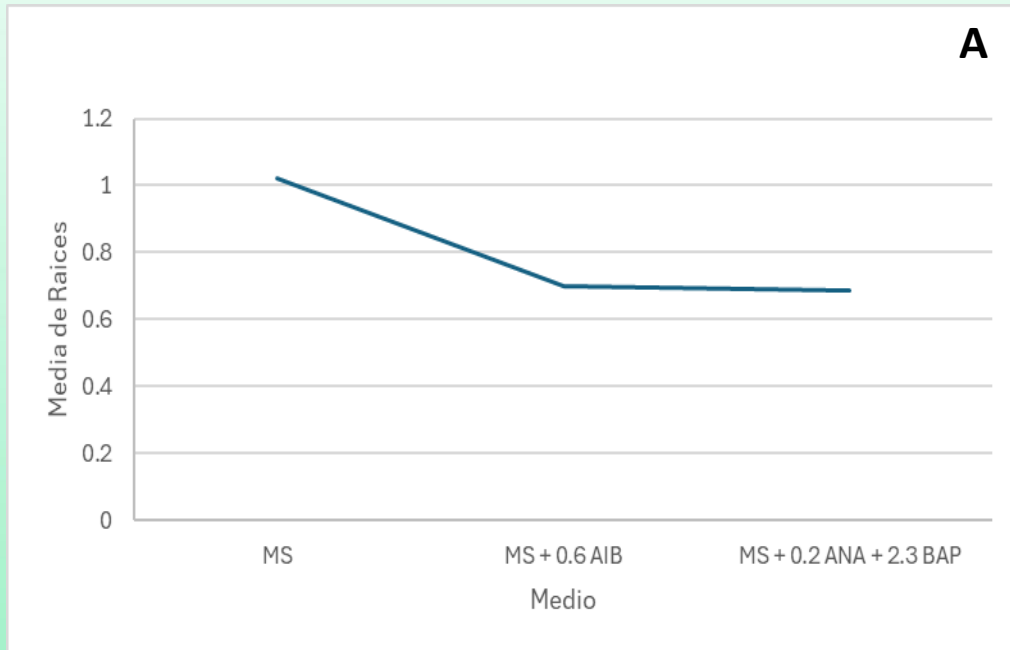


**Tabla 3.** El Test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey es un test de comparaciones múltiples.

36 Subconjuntos homogéneos			
37			
38 Raíces			
39 HSD Tukey <sup>a,b</sup>			
	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
40 Medio		1	
41 MS + 0.2 ANA + 2.3	51	0.69	
42 MS + 0.6 AIB	40	0.70	
43 MS	47	1.02	
44 Sig.		0.487	
45			
46 Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos			
47 a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 45,534.			
48 b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media			
49			
50 Longitud (cm)			
51 HSD Tukey <sup>a,b</sup>			
	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
52 Medio		1	2
53 MS + 0.2 ANA + 2.3	51	13.710	
54 MS + 0.6 AIB	40		18.253
55 MS	47		19.147
56 Sig.		1.000	0.856
57			

Carbajal, Nimbe (2018); Carhuarica et al., (2012)





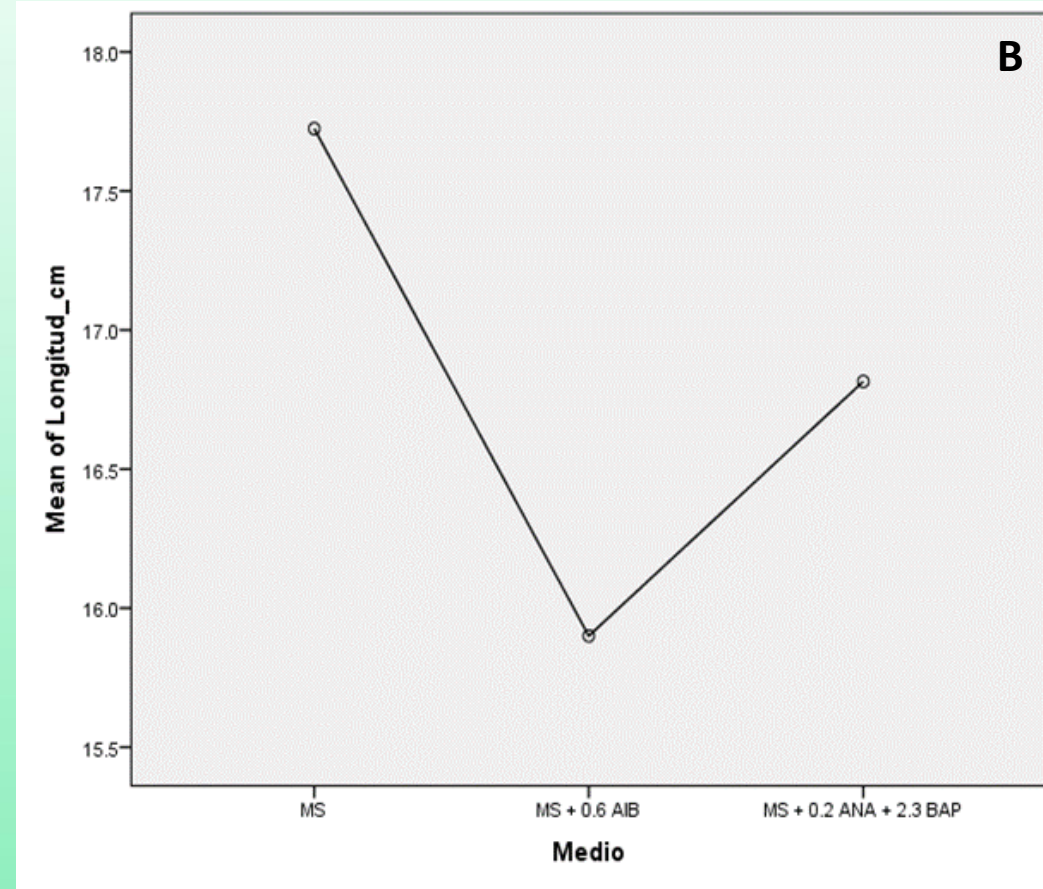
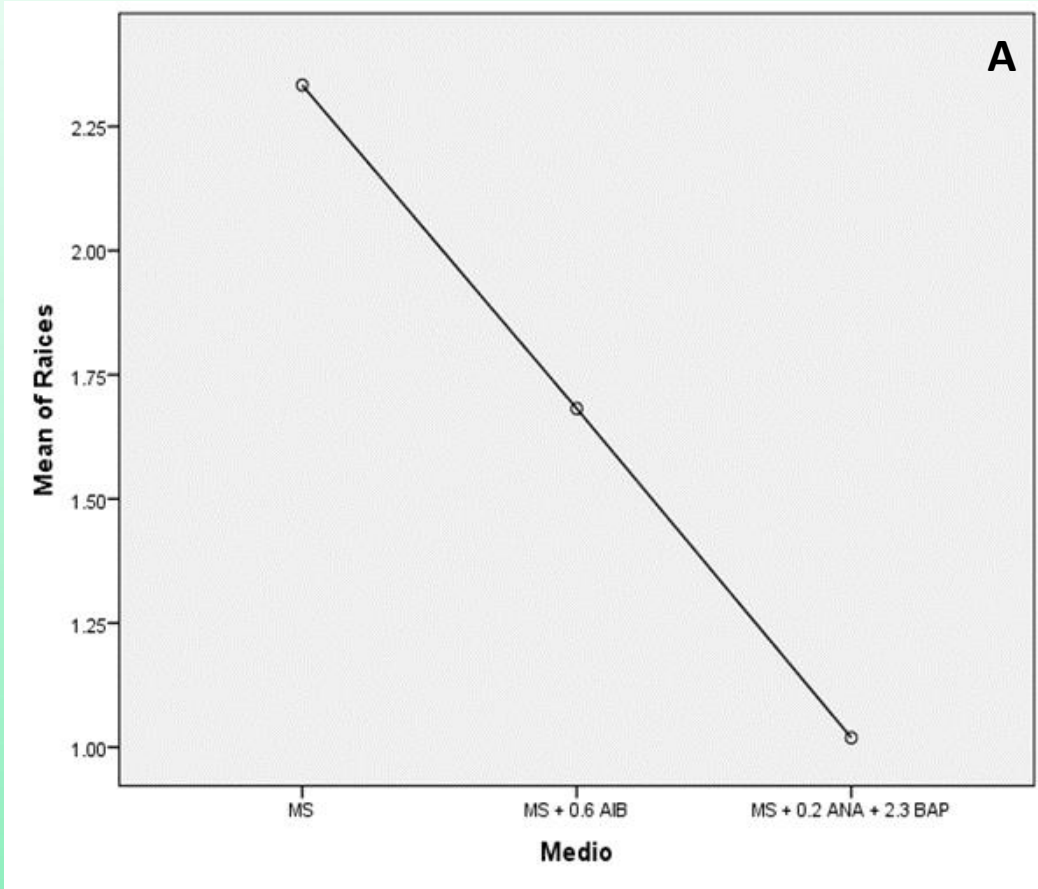
**Gráfico 1. A)** Media de raíces en los medios de establecimiento . **B)** Media de longitud en los medios de establecimiento.



**Tabla 4.** Análisis ANOVA, etapa de establecimiento ajo Clon Katín.

1	<b>Etapa de Establecimiento Ajo Katín</b>					
2	<b>ANOVA</b>					
3			Sum of Squares	df	Mean Square	F Sig.
4	<b>Raices</b>	Between Groups	42.157	2	21.078	5.135 0.007
5		Within Groups	570.527	139	4.105	
6		Total	612.683	141		
7	<b>Longitud (cm)</b>	Between Groups	74.054	2	37.027	0.556 0.575
8		Within Groups	9254.711	139	66.581	
9		Total	9328.765	141		
35	<b>Raices</b>					
36	Tukey HSD <sup>a,b</sup>					
37				Subset for alpha = 0.05		
38	Medio	N		1	2	
39	MS + 0.2	53		1.02		
40	ANA + 2.3				1.68	1.68
41	MS + 0.6 AIB	44		1.68		
42	MS	45			2.33	2.33
43	Sig.			0.255	0.267	
44	Means for groups in homogeneous subsets are displayed.					
45	a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 47.009.					
46	b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the					
47						
48	<b>Longitud_cm</b>					
49	Tukey HSD <sup>a,b</sup>					
50				Subset for alpha = 0.05		
51	Medio	N		1		
52	MS + 0.6 AIB	44		15.90		
53	MS + 0.2	53		16.82		
54	ANA + 2.3					
55	MS	45		17.72		
56	Sig.			0.526		
57	Means for groups in homogeneous subsets					





**Gráfico 2. A)** Media de raíces en ajo Clon Katín etapa de establecimiento **B)** Media de longitud en ajo Clon Katín etapa de establecimiento.



## Etapa de Microbulbos Ajo Morado

Tabla 5. Análisis ANOVA, etapa de Microbulbos ajo Clon Morado

1		Desarrollo de Microbulbo Ajo Morado					
2		ANOVA					
3		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	
4	Diametro_m m	Between Groups	14.787	4	3.697	0.662	0.621
5		Within Groups	351.726	63	5.583		
6		Total	366.513	67			
7	Peso_g	Between Groups	2.042	4	0.510	1.956	0.112
8		Within Groups	16.438	63	0.261		
9		Total	18.480	67			

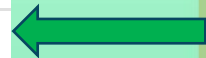


**Tabla 6.** Test HSD Tukey en la etapa de Microbulbos ajo Clon Morado.

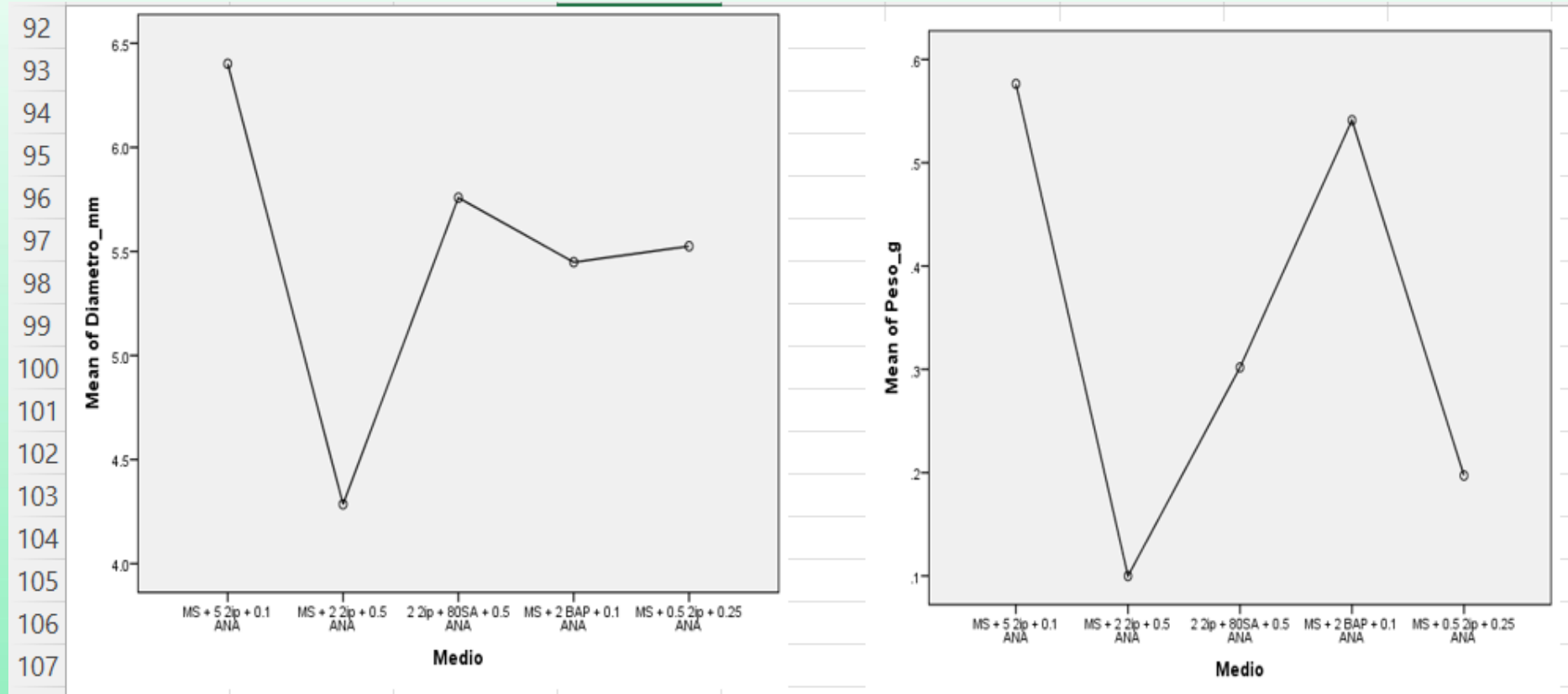
Diametro_mm			
Tukey HSD <sup>ab</sup>			
			Subset for alpha = 0.05
Medio	N		1
MS + 2 2ip + 0.5 ANA	4		4.29
MS + 2 BAP + 0.1 ANA	17		5.45
MS + 0.5 2ip + 0.25ANA	25		5.52
2 2ip + 80SA + 0.5 ANA	11		5.76
MS + 5 2ip + 0.1 ANA	11		6.40
Sig.			0.305



Peso_g			
Tukey HSD <sup>ab</sup>			
			Subset for alpha = 0.05
Medio	N		1
MS + 2 2ip + 0.5 ANA	4		0.10
MS + 0.5 2ip + 0.25ANA	25		0.20
2 2ip + 80SA + 0.5 ANA	11		0.30
MS + 2 BAP + 0.1 ANA	17		0.54
MS + 5 2ip + 0.1 ANA	11		0.58
Sig.			0.267



Mujica, Henry & Mogollón, Norca (2004) ; Ynfante Isanna (2016)



**Gráfico 3.** Diámetro y peso en la etapa de microbulbo ajo Morado.



## Etapa de Microbulbos Ajo Katín

**Tabla 7.** Análisis ANOVA, etapa de Microbulbos ajo Clon Katín

1		<b>Desarrollo de Microbulbo Ajo Katín</b>						
2		<b>ANOVA</b>						
3		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
4	Diametro_m m	Between Groups	43.488	3	14.496	3.779	0.016	←
5		Within Groups	207.163	54	3.836			
6		Total	250.651	57				
7	Peso_g	Between Groups	6.882	3	2.294	6.132	0.001	←
8		Within Groups	20.201	54	0.374			
9		Total	27.083	57				
10								



**Tabla 8.** Test HSD Tukey en la etapa de Microbulbos de ajo Clon Katín.

Diametro_mm				
Tukey HSD <sup>ab</sup>				
Medio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
MS + 2 BAP + 0.1 ANA	14	5.00		←
MS + 5 2ip + 0.1 ANA	11	6.22	6.22	
2 2ip + 80SA + 0.5 ANA	16	6.47	6.47	
MS + 2 2ip + 0.5 ANA	17		7.37	→
Sig.		0.207	0.409	

Means for groups in homogeneous subsets are

Peso_g				
Tukey HSD <sup>ab</sup>				
Medio	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	
MS + 2 BAP + 0.1 ANA	14	0.15		
2 2ip + 80SA + 0.5 ANA	16	0.32		
MS + 5 2ip + 0.1 ANA	11	0.38		
MS + 2 2ip + 0.5 ANA	17		1.02	→
Sig.		0.741	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are





## Eliminación del Virus (*OYDV*)

**Tabla 9.** post- termoterapia y cultivo in vitro de meristemos con 36 °C

Clones	Muestras Analizadas	Muestras Negativas	Muestras Positivas
Katín	4	0	4
Morado	1	0	1
<b>Totales</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>



(Conci & Nome 1991; Robert et al. 1998; Perotto et al. 2003; Conci et al. 2005; Ramirez-Malagon et al. 2006; Shibolet et al. (2001; Gholam Khodakaramian et al., 2013.



**Tabla 10** . post- termoterapia y cultivo in vitro de meristemos con 38 °C

Clones	Muestras Analizadas	Muestras Negativas	Muestras Positivas
Katín	6	4	2
Morado	6	2	4
<b>Totales</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

R. Velásquez-Valle et al (2016)



## Detalles sobre los resultados de estudio

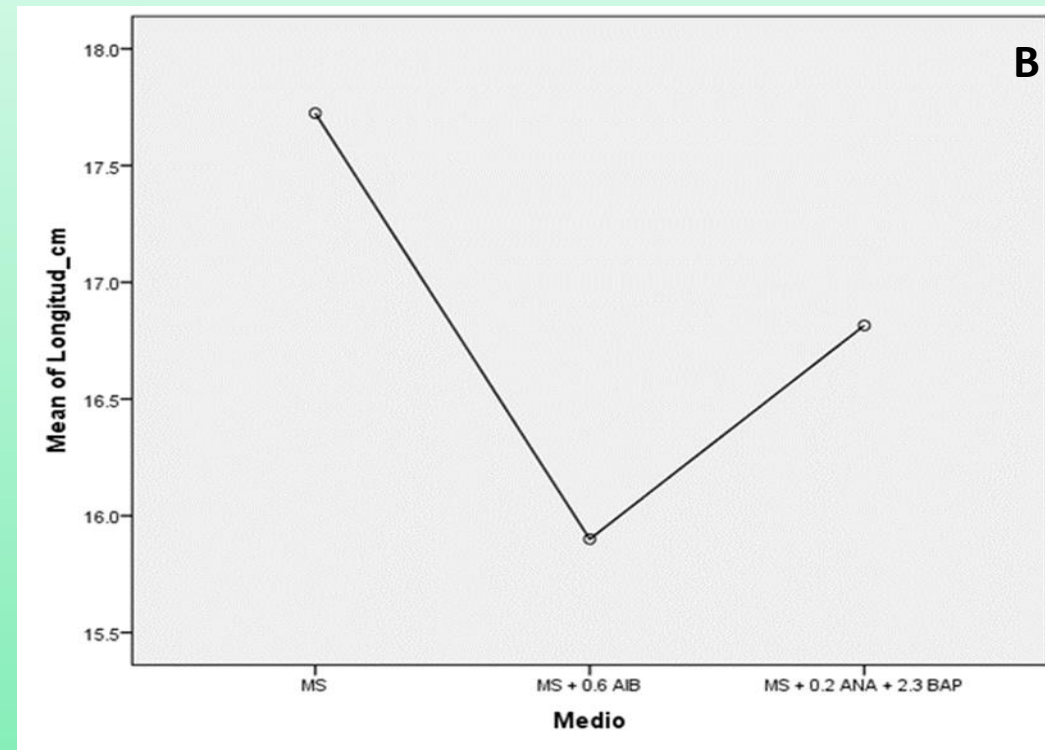
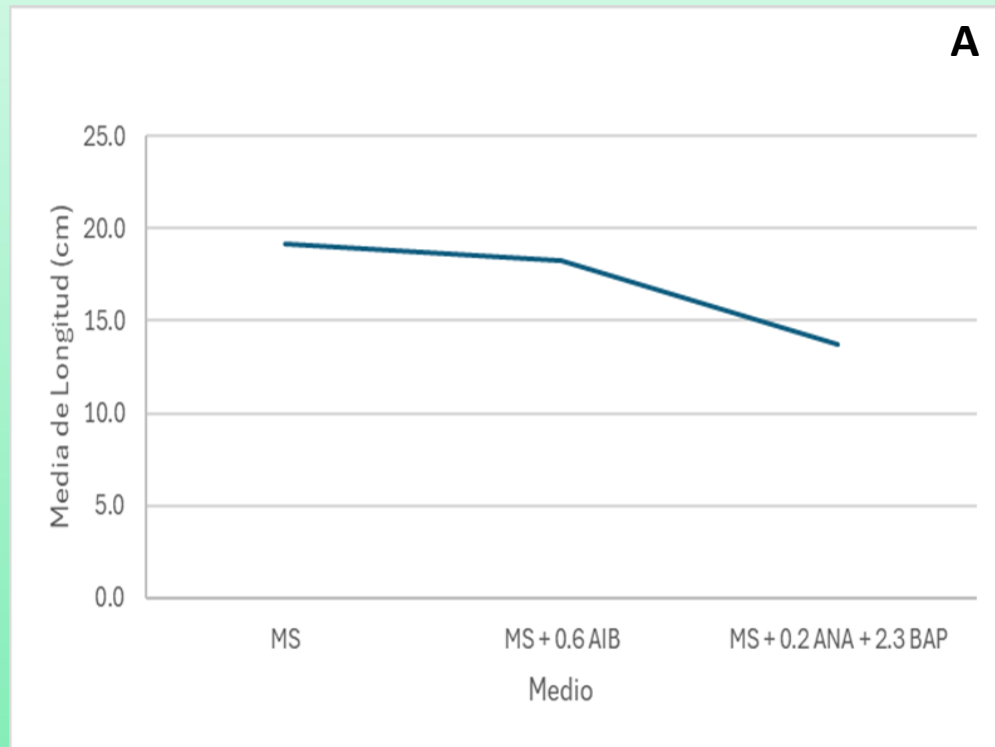
*“El procedimiento de **termoterapia** implica la exposición continua de las plantas a una temperatura alta (alrededor de **36-38 °C**) cerca de los límites máximos de su **tolerancia fisiológica** por períodos de tiempo. La temperatura alta tiene un **efecto letal** en la planta, por lo que, la temperatura óptima es una comparación entre la supervivencia de la planta y la eliminación viral”. Walky (1990)*

40°C.	31	05	16.12%
-------	----	----	--------



Carbajal, Nimbe (2018), donde en su estudio estableció que: *Las plántulas in vitro que corresponden al medio de cultivo MS enriquecido solamente con vitaminas tuvieron el mayor crecimiento longitudinal.*

Carhuarica et al., (2012) el crecimiento mayor de las plántulas se debe inicialmente a la **concentración de macros y micronutrientes**, no tanto por la influencia de los reguladores de crecimiento.



**Gráfico 4. A y B) Media de longitud en ambos clones de ajo.**



# Desarrollo de Microbulbos

Para el desarrollo de Microbulbos en nuestro caso los mayores rendimientos relacionados al diámetro y al peso se obtuvieron al usar la combinación de 2-isopentilamina (2-ip) con el ácido naftalenacético (ANA), citoquinina y auxina respectivamente. En el caso de los Microbulbos Morados el diámetro fue en promedio de 6.40 (mm) y el peso de 0.58 (g), mientras que para el Katín fue de 7.37 (mm) y 1.02 (g).

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Henry Mujica y Norca Mogollón en su trabajo “Bulbificación in vitro de ajo (*Allium sativum* L.) Con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. En dicho trabajo se estableció que: Ocho semanas después de iniciado el experimento, los bulbos alcanzaron una masa promedio de 0,627 g y un diámetro promedio de 10,93 mm, en la dosis de 2,0 mg·L<sup>-1</sup> de 2-ip.

Resultados similares también obtuvo Isanna Michel Victoriano Ynfante en su trabajo “Producción in vitro de micro bulbos de ajo (*Allium sativum*)” donde se estableció que: El tratamiento 0.5 2iP+0.25ANA presentó los mejores resultados de peso y diámetro del micro bulbo 1.18 g y 10.52 mm.



## Resultados de la Eliminación del Virus *OYDV*

Un adverso resultado pudiera verse impactado por la **baja temperatura aplicada**, la (más baja utilizada en este trabajo), de igual modo, pudiera corroborarse lo establecido en el trabajo “*Combination of stem-disc dome culture and thermotherapy to eliminate Alexiviruses and Onion yellow dwarf virus from garlic (Allium sativum cv. Hamedan)*” en donde se establece que:

*Los resultados mostraron que la eficiencia de la eliminación viral dependía del tipo de virus, técnica de tratamiento aplicada y duración de la termoterapia.*

De la misma manera, el trabajo antes citado explica que: *la inhibición en la eliminación del OYDV puede deberse a la aplicación de bajas temperaturas en la termoterapia*, lo que podría estar en consonancia con nuestro trabajo, ya que, cuando no se logró eliminar el virus fue cuando la más baja temperatura fue usada.

**Tabla 11.** post- termoterapia a 36°C

Clones	Muestras Analizadas	Muestras Negativas	Muestras Positivas
Katín	4	0	4
Morado	1	0	1
<b>Totales</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>



# Conclusiones

Nuestro trabajo arrojó que la termoterapia combinada con el cultivo in vitro de meristemas tiene aceptables resultados cuando se usan **38°C**. En este sentido, fue la temperatura óptima para ello, logrando eliminar el virus *OYDV* en un **50%**.

En cambio, los resultados al usar la temperatura a 36°C y 40°C no fueron los esperados. Cuando se usó la temperatura **de 36°C** no fue posible eliminar el virus *OYDV*. Mientras que, cuando se usó la temperatura a **40°C** el % de supervivencia a esta fue muy bajo, lo que imposibilitó rehacer pruebas TR-PCR.

El medio de cultivo donde hubo mayor longitud y presencia de raíces en ambos clones fue el **(MS) sin reguladores de crecimiento** en la etapa de establecimiento. Para la etapa de desarrollo de Microbulbos los mejores medios fueron **MS 5 2ip + 0.1 ANA** para el ajo Morado y **MS 2 2ip + 0.5 ANA** para el ajo Katín. Combinación de **citoquinina** y **auxina** respectivamente.

Para la etapa de formación de Microbulbos recomendamos la combinación de citoquininas y auxinas (**2ip – ANA**).

Para mejores resultados en la aplicación de la termoterapia recomendamos pues la implementación de otros tiempos de duración y de otras técnicas de esta como la **inmersión el agua** a 50°C/h.



# Importancia de la Investigación

La importancia de nuestra investigación se basa en varios puntos que son:

- ✓ Control Eficaz del OYDV.
- ✓ Alternativa a los Métodos Químicos.
- ✓ Contribuciones Científicas y Técnicas.
- ✓ Relevancia Económica.
- ✓ Impulso a la Investigación Futura.
- ✓ Sostenibilidad y Seguridad Alimentaria.





# Agradecimientos y colaboradores

Agradecemos al MESCyT y al FONDOCyT por ser los financiadores de este proyecto de investigación.

A nuestra alma mater, Universidad Autónoma de Santo Domingo y a la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, nuestros asesores, maestros y colaboradores en general.

**¡Muchas Gracias!**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SANTO DOMINGO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS  
Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias





*¡Gracias!*



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SANTO DOMINGO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS Y VETERINARIAS**  
**Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias**

