

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**TERMOTERAPIA Y CULTIVO *IN VITRO* DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)  
PARA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA  
CEBOLLA**

**PRESENTA**

**NIMBE NAYELI CARBAJAL CRUZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**JUNIO, 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**TERMOTERAPIA Y CULTIVO *IN VITRO* DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)  
PARA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA  
CEBOLLA**

**PRESENTA**

**NIMBE NAYELI CARBAJAL CRUZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**JUNIO DE 2018**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**TERMOTERAPIA Y CULTIVO *IN VITRO* DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.)  
PARA LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DEL ENANISMO AMARILLO DE LA  
CEBOLLA**

**PRESENTA**

**NIMBE NAYELI CARBAJAL CRUZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**JUNIO DE 2018**

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL  
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR:

---

Dra. Ma. Del Carmen Ojeda Zacarías  
Asesor principal

---

Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez  
Asesor Auxiliar

---

Dr. Emilio Olivares Sáenz  
Asesor Auxiliar

---

Dra. Adriana Gutiérrez Díez  
Subdirectora de Estudios de Posgrado e Investigación

## **DEDICATORIA**

Con todo el amor dedico mi investigación a Dios, agradezco la oportunidad que me brindaste de iniciar y concluir este proyecto. Me hiciste recordar que tus tiempos son perfectos y me enseñaste a confiar en ti. Aun en las adversidades entendí que siempre tienes el control y la última palabra. Me ayudaste a obtener un logro en la trayectoria de mi vida profesional y nunca soltaste mi mano hasta el día de hoy se que me acompañas al concluir este ciclo.

Agradezco a mis padres Mary Laura y Carlos Enrique por brindarme su amor y apoyo incondicional desde el momento que inicie mi carrera profesional. Ustedes han sido mis pilares más fuertes para impulsarme a salir siempre adelante, los admiro, respeto y son mi ejemplo a seguir. Mis hermanas Karla Ivett y Leisy Dianet por estar incondicionalmente conmigo en cada decisión de mi vida, por esa unión y amor que me regalan día a día y hoy puedo decir que son mis verdaderas amigas desde siempre. Carlitos Daniel eres la bendición más linda que llego en nuestras vidas convirtiéndote en una razón más para seguir adelante. Javier Rosales por ser parte de nuestra familia y por tus consejos que me brindaste. Familia agradezco infinitamente a Dios por tenerlos a mi lado y seguir siendo un equipo.

A mis maestros que han estado a lo largo de mi formación profesional. Dr. Francisco Pissani, Dr. Alejandro del Bosque, Dr. Elías Treviño, Dr. Rigoberto Vázquez y M.C. Jesús Monsivaís gracias por brindarme su apoyo, sus consejos y principalmente creer en mi y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado y darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Dra. Ma. Del Carmen Ojeda gracias por cada una de sus asesorías, por sus consejos y darme la oportunidad de realizar mis estudios en su área de investigación.

A mis asesores integrantes del comité Dr. Omar Alvarado Gómez por compartir sus conocimientos en el área de diagnóstico molecular. Gracias por su paciencia y el apoyo que me dio hasta finalizar este estudio. Dr. Emilio Olivares Sáenz le agradezco por siempre apoyarme desde que inicie mi formación académica, por cada uno de sus consejos, conocimientos y el tiempo dedicado a mi investigación.

Dr. Gerardo Mendez Zamora gracias por sus aportaciones y asesorías brindadas realmente fueron de gran ayuda y valoro el tiempo dedicado a mi estudio.

Al M.C. Jesús A. Pedroza Flores agradezco por la donación del material vegetal dando inicio y desarrollo del estudio. Dr. Ramiro González gracias por permitirme hacer uso de las instalaciones de Biociencia. Dra. Juanita Aranda por sus consejos y la oportunidad de usar equipos de su área de trabajo. Dr. Victor Aguirre y Dra. Orquidea Pérez agradezco el impulsarme a concluir esta etapa y seguir con mis estudios. A mis amigos Alejandro Ibarra, Iván Pequeño, Eduardo Jiménez y Arturo Juárez por su apoyo incondicional y colaborar al desarrollo de mi investigación. A mis chicos del laboratorio de Ciencias Naturales Belén, Isi Magdiel, Edith, Jafet, Franco y Emiliano les doy gracias por motivarme a concluir este ciclo simplemente los aprecio.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ABREVIATURAS.....	XX
RESUMEN .....	XXII
ABSTRACT .....	XXIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Cultivo del Ajo ( <i>Allium sativum</i> L.).....	4
2.1.1. Origen .....	4
2.1.2. Historia .....	5
2.2. Taxonomía del Ajo .....	5
2.3. Descripción Bótanica de <i>Allium sativum</i> L. ....	6
2.3.1. Hoja.....	6
2.3.2. Tallo .....	7
2.3.3. Raíz.....	7
2.3.4. Bulbo .....	7
2.3.5. Bulbillos o Dientes.....	8
2.3.6. Escapo Floral .....	8

2.4.	Principales Usos de <i>Allium sativum</i> L. ....	8
2.4.1.	Propiedades Medicinales .....	9
2.4.2.	Propiedades Antimicrobianas.....	10
2.4.3.	Propiedades Antifúngicas.....	10
2.5.	Importancia Económica de <i>Allium sativum</i> L.....	10
2.6.	Consumo y Principales Usos en México del Cultivo <i>Allium sativum</i> L. ....	11
2.7.	El Cultivo de <i>Allium sativum</i> en Nuevo León.....	12
2.8.	Principales Virus que Afectan el Cultivo de Ajo .....	13
2.8.1.	Virus del Enanismo Amarillo de la Cebolla (OYDV) .....	14
2.8.2.	Virus Rayado Amarillo del Puerro (LYSV).....	16
2.8.3.	Virus Latente del Shallot (VLS) .....	17
2.8.4.	Virus Latente Común del Ajo (GarCLV) .....	17
2.8.5.	GarV-A,B,C,D Y X.....	18
2.9.	Propagación Tradicional .....	18
2.9.1.	Desventajas de la Propagación Tradicional .....	19
2.10.	Importancia del Cultivo de Tejidos Vegetales .....	19
2.10.1.	Aplicación del Cultivo de Tejidos Vegetal.....	20
2.11.	Factores que Intervienen en el Cultivo de Tejidos .....	20
2.11.1.	Explante .....	21
2.11.2.	Contaminación Microbiana.....	21
2.12.	Medio de Cultivo .....	21
2.12.1.	Tamaño de Explante .....	22
2.12.2.	Edad Fisiológica.....	22
2.13.	Importancia de la Micropropagación <i>in vitro</i> .....	23

2.13.1.	Ventajas de la Micropropagación <i>in vitro</i> .....	23
2.13.2.	Etapas de la Micropropagación <i>in vitro</i> .....	24
2.14.	Cultivo <i>in vitro</i> de Meristemas .....	28
2.15.	La Termoterapia.....	29
2.16.	Prueba de Diagnóstico Serológico ELISA.....	30
2.17.	Técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR).....	31
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.1.	Localización del Experimento .....	32
3.2.	Material Vegetal .....	32
3.3.	Condiciones Experimentales de Termoterapia .....	32
3.4.	Establecimiento <i>in vitro</i> de Meristemas y Ápices .....	34
3.5.	Medios de Cultivos.....	36
3.5.1.	Establecimiento <i>in vitro</i> de Ápices y Meristemas.....	36
3.5.2.	Etapas de Inducción de Brotes .....	37
3.5.3.	Etapas de Proliferación de Brotes <i>in vitro</i> .....	39
3.5.4.	Enraizamiento de Brotes <i>in vitro</i> .....	40
3.6.	Diseño Experimental .....	40
3.7.	Análisis Serológico Elisa de los Bulbos de <i>Allium sativum</i> L.....	41
3.8.	Análisis Molecular por RT-PCR .....	43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
4.1.	Diagnóstico Serológico ELISA .....	46
4.2.	Diagnóstico del Análisis Molecular por RT-PCR .....	46

4.3.	Secuenciación y Comparación de ADN de Bulbos de Ajo .....	47
4.4.	Análisis por RT-PCR de Plántulas <i>in vitro</i> .....	47
4.5.	Análisis por RT-PCR en Explantes Expuestos a Termoterapia y Regenerados <i>in vitro</i> .....	48
4.6.	Establecimiento <i>in vitro</i> de Ápices Caulinares y Domos Meristemáticos ....	53
4.7.	Inducción de Brotes del Cultivar DF Inoculados en Medio Nutritivo MS y LS .....	53
4.8.	Efecto de la Termoterapia en el Establecimiento <i>in vitro</i> .....	55
4.9.	Evaluación del Crecimiento de Explantes Expuestos a Termoterapia .....	56
4.10.	Etapa de Inducción y Proliferación de Brotes <i>in vitro</i> .....	59
4.11.	Crecimiento Longitudinal de Plántulas <i>in vitro</i> .....	65
4.12.	Etapa de Enraizamiento de Plántulas <i>in vitro</i> .....	67
5.	CONCLUSIONES.....	70
6.	RECOMENDACIONES.....	72
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	73

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ubicación taxonómica de <i>Allium sativum</i> L.....	6
2	Producción de los principales estados productores de ajo en México.....	11
3	Condiciones experimentales de termoterapia con calor seco y húmedo.....	33
4	Componentes del medio basal MS y LS .....	38
5	Tratamientos para inducir el crecimiento longitudinal de explantes subcultivados a 15 días del establecimiento <i>in vitro</i> . .....	39
6	Tratamientos de la etapa de inducción y proliferación de brotes.....	42
7	Resultado de la prueba serológica Elisa de seis virus.....	46
8	Diagnóstico molecular por RT-PCR de plántulas regeneradas <i>in vitro</i> .....	52
9	Comparación de medias del crecimiento longitudinal de los explantes.....	56

10	Porcentaje de inducción y número de brotes a 20 y 40 d en DF y Tig.....	60
----	--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	a) Plantas de <i>Allium sativum</i> L. asintomáticas con una producción de bulbos de excelente calidad y de un tamaño considerable, b) Plantas con síntomas de clorosis en el haz de las hojas y su cosecha son bulbos con reducciones en peso y tamaño.....	16
2	Etapas de la micropropagación. a) Establecimiento aséptico <i>in vitro</i> , b) Proliferación de brotes, c) Enraizamiento de plántulas regeneradas <i>in vitro</i> , e) Etapa de aclimatación de las plántulas <i>ex vitro</i> .....	24
3	Termoterapia. a) Incubadora (bulbillos expuestos a calor seco 40 °C por 20 y 40 d), b) Baño María (bulbillos sometidos a calor húmedo 50 °C por una hora).....	34
4	Proceso del establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Allium sativum</i> L. a) Predesinfección de los bulbillos, b) Desinfección de los explantes con NaClO 40 v/v, c) Extracción del ápice y meristemas inoculados en medio de cultivo basal MS.....	35
5	a) Corte longitudinal del bulbillo, b) Extracción del ápice caulinar de 3 cm de longitud, posteriormente 2.5 cm a 1 cm de longitud,	

	d) Extracción del domo meristemático con dos primordios foliares midiendo 0.5 mm, d) Tejido meristemático de un tamaño menor a 1 mm.....	36
6	Proceso de elaboración del Medio Nutritivo MS.....	37
7	a) Plántula <i>in vitro</i> obtenida de la etapa de inducción de brotes, b) Plántula de ajo seccionada bajo condiciones estériles, c) Explante de un tamaño de 1.5 cm y posteriormente se inocularon en medios de cultivo nutritivo para la etapa de proliferación de brotes.....	40
8	Proceso del análisis molecular RT-PCR. a) Muestra compuesta de bulbos, b) Segunda muestra integrada por hojas de plántulas regeneradas <i>in vitro</i> , c) Maceración del tejido vegetal a partir de 50 mg, d) Extracción del ARN por el método trizol, e) Síntesis de ADNc, f) Amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR g) Preparación del gel de agarosa al 1 %, h) Electroforesis corrido por 40 min a 100 v, i) Visualización de los geles mediante una tinción con bromuro de etidio observados en un transiluminador de luz ultravioleta.....	45
9	Electroforesis en un gel de agarosa al 1 % de los productos obtenidos de la amplificación por PCR del virus OYDV a partir de ARN de bulbos de ajo de los cultivares DF y Tig del municipio de Aramberri N.L.....	47

10	Resultado de la secuenciación comparada con el banco de genes GenBank con un 98% de identidad al OYDV.....	47
11	Resultado de dos tipos de explantes en el gel de agarosa al 1 % tuvieron amplificaciones de bandas de 318 pb correspondientes al OYDV.....	48
12	Amplificaciones por RT-PCR del ADNc del OYDV en muestras obtenidas de hojas de plántulas <i>in vitro</i> regeneradas a partir de ápices caulinares del cultivar DF. En la parte inferior se observa el número de los tratamientos.....	49
13	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % dónde hubo amplificación de producto por PCR del OYDV haciéndose presente en muestras de cultivo <i>in vitro</i> de meristemas del cultivar DF en los T5 Y T8.....	50
14	Productos amplificados en gel de agarosa al 1 % correspondiendo al OYDV del T9 cultivar Tig. En el T10, T11 y T12 no se produjo ninguna banda amplificada de ADNc del OYDV.....	51
15	Detección molecular por RT-PCR para detección del OYDV de muestras de plántulas del cultivar Tig obtenidas a partir de meristemas en conjunto con termoterapia, se Incluyo un control positivo.....	52

16	Explantes de <i>Allium sativum</i> L. inoculados en medio de cultivo MS. a) Domos meristemáticos en el establecimiento aséptico de tamaño aproximado de 2 mm, b) Domos meristemáticos con 100 % de asepsia a los 7 d del establecimiento, c) Ápices caulinares a los 7 d posteriores al establecimiento aséptico.....	53
17	Prueba de medias por Tukey en tres tratamientos (MS, MS+BAP y LS+BAP) la variable a medir fue el crecimiento longitudinal de las plántulas <i>in vitro</i> .....	54
18	Plántulas regeneradas <i>in vitro</i> del cultivar DF a 14 d del subcultivo en tres medios nutritivos enriquecido con vitaminas y BAP.....	55
19	Efecto de la termoterapia a los 14 d del establecimiento aséptico en dos tipos de explante:ápices y domos meristemáticos de los cultivares DF y Tig alcanzando el 100 % de supervivencia el material vegetal que no recibió tratamientos térmicos.....	56
20	Crecimiento longitudinal a los 21 d del establecimiento <i>in vitro</i> . .....	57

21	Efecto de la interacción de dos cultivares (DFy Tig) analizadas a 21 d de su establecimiento <i>in vitro</i> donde los explantes tuvieron cuatro condiciones de termoterapia evaluándose el crecimiento longitudinal.....	58
22	Efecto de la interacción tipo de explante y condiciones térmicas que fueron sometidos los bulbillos previo al establecimiento aséptico. ....	59
23	Número de brotes por explante de los cultivares DF y Tig a 40 d del subcultivo en medios con citocininas.....	61
24	Plántulas regeneradas <i>in vitro</i> de dos cultivares DF y Tig. a) Brotes adventicios del cultivar DF a 40 d, b) Brotes adventicios regenerados <i>in vitro</i> en el cultivar Tig a 40 d del subcultivo.....	61
25	Efecto de la interacción de los factores de dos cultivares (DF y Tig) y la citocinina 2-iP (0.0 y 1.5 mgL <sup>-1</sup> ) en el número de brotes adventicios diferenciados.....	62
26	Brotes adventicios desdiferenciados en medios suplementados con 2-iP, a) Cultivar Tig produjo una tasa de 2.69 brotes por explante, b) Cultivar DF una tasa de 3.45 brotes por plántula.....	62
27	Efecto de las interacciones cultivar (Tig y DF) y BAP (0 y 1.5 mgL <sup>-1</sup> ).....	63

28	Interacción de los factores 2-iP y BAP (0 y 1.5 mg <sup>-1</sup> ) .....	64
29	Resultado de la interacción de los cultivares (Tig y DF) y las hormonas de crecimiento (2-iP y Kin).....	65
30	Crecimiento longitudinal de las plántulas <i>in vitro</i> con un tamaño inicial de 1.5 cm evaluados a 10, 20, 30 y 40 d de los cultivares Tig y DF.....	66
31	<i>Allium sativum</i> L. <i>in vitro</i> subcultivados al medio nutritivo MS complementado con citocininas a 40 d con un tamaño aproximado de 9.4 cm.....	66
32	Plántulas regeneradas <i>in vitro</i> subcultivadas en las sales básicas del MS en la etapa de enraizamiento, a) <i>Allium sativum</i> L. sin crecimiento radicular, b) 20 d del subcultivo formación de una raíz, c) 30 d transcurridos se induce una raíz en el explante, d) 40 d posteriores al subcultivo las plántulas desarrollan dos raíces .....	68
33	Inducción del crecimiento radicular en plántulas regeneradas <i>in</i> <i>vitro</i> subcultivadas en las sales básicas del MS y adicionado con citocininas a los 20, 30 y 40 d.....	68

34	Bulbos de <i>Allium sativum</i> L. bajo condiciones de termoterapia, b) Predesinfección y desinfección de los bulbillos, c) Extracción de ápice y domo meristemáticos, d) Crecimiento de domos meristemáticos desde primer día del establecimiento a 21 d en medio MS, d) Crecimiento de ápices de 0-14 d inoculados en MS, F) Etapa de proliferación de brotes y enraizamiento de las plántulas regeneradas <i>in vitro</i> apartir de ápices y domos meristemáticos.....	69
----	--	----

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADN <sub>C</sub>	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
ANA	Ácido Naftalenacético
ARN	Ácido Ribonucleico
BAP	6-Bencilaminopurina
cm	Centimetro
d	Día
DF	Don Fermín
FV	Fuente de Variación
GarCLV	Virus Latente Comun del Ajo
GenBank	Banco de genes
gL <sup>-1</sup>	Gramos por Litro
h	Hora
ha	Hectárea
HCl	Ácido Clorhídrico
IBA	Ácido Indolbutírico
Kin	Kinetina
lb	Libras
LS	Linsmaier
min	Minuto

$\mu\text{m}$	Micrómetro
mm	Milimetro
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{MgCl}_2$	Cloruro de Magnesio
$\text{mgL}^{-1}$	Miligramos por Litro
MS	Murashige y Skoog
NaClO	Hipoclorito de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanometro
OYDV	Virus del Enanismo Amarillo de la Cebolla
SLV	Virus Rayado Amarillo del Puerro
t	Toneladas
T	Tratamientos
Tig	Tigre
Tween-20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate
v/v	Volumen sobre Volumen
VLS	Virus Latente del Shallot
RT-PCR	Transcripción Inversa y Reaccion en Cadena de Polimerasa
S	Segundo
Sig	Significancia
SPSS	Statiscal Package for the Social Sciences
%	Porcentaje
2-ip	2-isopenteniladenine
$^{\circ}\text{C}$	Grado Celcius

## RESUMEN

El virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) es un potyvirus que afecta el rendimiento y calidad de los bulbos del ajo, reduciendo más del 50 % de su producción. Una alternativa viable para el saneamiento ha sido el cultivo *in vitro* y la termoterapia. En esta investigación fue aplicada termoterapia (40 °C por 20 y 40 d y 50 °C/ 1 h) y el cultivo *in vitro* con la finalidad de obtener plantas libres de virus. La RT-PCR fue usada para el diagnóstico y detección del OYDV en plántulas *in vitro* obtenidas a partir de la regeneración de ápices y meristemos.

Para la inducción de proliferación de brotes se usaron tres citocininas: 2-isopenteniladenine (2-iP), Bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (Kin) en concentraciones 0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos en los bulbillos mostraron que la temperatura de 40 °C durante 20 y 40 d con explantes de uno a tres milímetros influye en la eliminación del virus, con una tasa de supervivencia a los 20 d del 75 % y a los 40 d un 65 %. La temperatura a 40 °C por tiempos más prolongados (40 d) afecta el crecimiento longitudinal de los explantes. El cultivo *in vitro* y la termoterapia pueden eliminar el OYDV. La proliferación de brotes se logró con el uso de Kin a los 40 d con un promedio de 3.4 brotes por explante y una altura promedio de 6.9 cm. Así mismo se evaluó el enraizamiento en los mismos medios de cultivo con un promedio de una raíz por explante.

## ABSTRACT

The onion yellow dwarf virus (OYDV) is a potyvirus that affects the performance and quality of garlic bulbs. Consequently, in this study, it was decided to use thermotherapy (40 °C for 20 and 40 d and 50 °C/1 h) and *in vitro* culture to obtain virus-free plants. RT-PCR was used for OYDV diagnosis and detection on *in vitro* seedlings obtained from meristems. Subsequently shoot proliferation was induced using three cytokinins: 2- isopentenyladenine (2-iP), Bencilaminopurine (BAP) and Kinetine (Kin) in 0 and 1.5 mgL<sup>-1</sup> concentrations.

The results obtained in the bulbs showed that at 40 °C temperature for 20 and 40 days in explant sizes from one to three mm influenced the elimination of the virus, with a survival rate at 75 % in 20 d and 65 % in 40 d. When exposed to 40 °C for a longer time (40 days), the length growth of explants was affected. Results showed that *in vitro* culture and thermotherapy can eliminate OYDV. The shoots proliferation was achieved with the use of Kin at 40 d with an average of 3.4 buds per explant and an average height of 6.9 cm. Rooting was also evaluated in the same culture media with an average of one root per explant.

## 1. INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es un cultivo de importancia económica y social debido a sus propiedades nutritivas, además contiene alicina y sulfatos que lo hacen que se caracterice por su peculiar sabor y aroma, siendo su principal uso con fines culinarios, seguido por el área agroindustrial y medicinal (Metwally *et al.*, 2012). El ajo es una especie agámica que no dispone de semilla botánica por lo que su forma de propagación tradicional es mediante los bulbillos, sin embargo esto facilita la transmisión de hongos, bacterias y virus ocasionando reducciones considerables en la producción y la calidad del cultivo (Pardo *et al.*, 2011; Parrano *et al.*, 2012). El material vegetal no certificado utilizado para la siembra es una de las principales causas que originan problemas fitopatológicos al cultivo.

Entre los patógenos que afectan el rendimiento del cultivo y la calidad de los bulbos se encuentran principalmente los virus, destacándose los géneros Potyvirus, Carlavirus y Allexivirus (Katis *et al.*, 2012) siendo los responsables de originar la enfermedad denominada el mosaico del ajo (Cafrune *et al.*, 2005). Uno de los potyvirus que más daño ocasiona a los cultivos del género *Allium* es el virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) (Chen y Adams, 2001) Dovas *et al.* (2001) reportaron que el OYDV causa daños considerables principalmente al follaje y a los bulbos por consecuencia tienen reducciones significativas en peso y el tamaño se reduce desde un 24 a un 60 % dependiendo del cultivar (Lot *et al.*, 1998). Algunos síntomas provocados por el OYDV son coloraciones amarillas y rayas cloróticas en el

haz de las hojas y su crecimiento se ve afectado al no desarrollarse. Se reporta que el OYDV es transmitido por más de 50 especies de áfidos (Bos, 1981), sin embargo también las plantas puede ser infectadas a causada de daños mecánicos (Diekmann, 1997) y por semilla contaminada (King *et al.*, 2011).

Hoy en día se tiene un gran interés por obtener semilla libre de virus que cumplan con cada uno de los estándares de calidad, mercadeo y la presentación de productos a nivel internacional (Lunello *et al.*, 2004). La biotecnología vegetal nos ofrece como una herramienta esencial el cultivo de meristemos *in vitro*, permitiendonos obtener plantas libres de patógenos en condiciones asépticas (Sánchez, 1995; Pérez, 1998; Perotto *et al.*, 2010). El cultivo de meristemos se distingue por ser la técnica más eficiente y utilizada para la producción de plantas de ajo libre de virus (Ghaemizadeh *et al.*, 2014). Sin embargo la erradicación de patógenos por cultivo *in vitro* de meristemo se ve limitada por el uso de explantes pequeños presentando cierto grado de dificultad al extraerlos e inocularlos en un medio de cultivo sin garantizar la obtención total de plantas libres de virus (Vieira *et al.*, 2015). Otro método viable de control sanitario es la termoterapia distinguiendose por ser efectivo y de fácil aplicación la cuál actúa en la erradicación de patógenos (Varés *et al.*, 2009). Las temperaturas elevadas y períodos prolongados de termoterapia son de mayor utilidad para inactivar virus, aunque pueden tener un efecto negativo sobre la regeneración y supervivencia de las plantas (Perotto *et al.*, 2003; Ghaemizadeh *et al.*, 2014). El objetivo del presente estudio fue desarrollar un protocolo de micropropagación vegetal para el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) libre de OYDV en dos cultivares (Don Fermín y Tigre).

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Cultivo del Ajo (*Allium sativum* L.)**

Uno de los géneros de plantas más grandes que existen es *Allium* que incluye más de 600 especies. La mayoría se caracteriza por ser bulbosas y algunas especies son cultivos comestibles teniendo gran demanda por la población (Block, 2010). De las especies que tienen importancia económica, el ajo se distingue por ser la segunda hortaliza de mayor importancia del género *Allium* con una producción anual de 11.79 millones de toneladas (Ochoa *et al.*, 2012). Los principales usos son culinarios, medicinal y agroindustrial (Rivlin, 2001; Singh y Singh, 2008).

#### **2.1.1. Origen**

*Allium sativum* L. tiene su origen en la región montañosa de Asia central integrada por los países de Kazajastán, Tayiquistán, Turkmenistán y Uzbekistán (Salunkhe y Desail, 1984; Fritsch y Friesen, 2002). Existen evidencias moleculares y bioquímicas que muestran una gran variabilidad en los clones que provienen de esos países (Cavagnaro y Galmarini, 2007). El cultivo creció de manera silvestre en regiones de China hasta la India y de Egipto a Ucrania siendo considerado su centro de origen (USDA, 2006). El Mediterráneo es considerado el centro secundario de origen debido a que fue el punto de partida donde la especie se extendió a los demás continentes a través de rutas comerciales (Maab y Klaas, 1995; Block, 2010). El ajo y otras especies del género *Allium* fueron un alimento muy popular en Egipto y otros lugares de la cuenca mediterránea (Block, 2010).

### **2.1.2. Historia**

*Allium Sativum* L. es uno de los cultivos hortícolas más antiguos reportados en la historia, inicialmente se hace referencia desde hace 5,000 años a la cultura egipcia e india. Los egipcios incluían en sus dietas principalmente ajo y cebolla atribuyendo ser una fuente de energía y de esta manera ellos resistían las arduas faenas durante la construcción de las pirámides (Peña-Iglesias, 1988). La historia mencionan que hace 4,500 años el ajo crecía en jardines del rey de babilonia y en China se reportan hace unos 2,000 años (USDA, 2006).

Asia central es reconocido como su centro de origen y con el tiempo el cultivo fue propagándose al área mediterránea extendiéndose a Egipto, China, posteriormente al continente Europeo y Africano (Mc Collum, 1976; Cabrera y Elliot, 1996). Los españoles, portugueses y franceses fueron los responsables de introducir el ajo al continente Americano como un cultivo a México, Estados Unidos, Perú y finalmente a Chile (Maab y Klaas, 1995; Kehr, 2002). *Allium sativum* L. a tenido una gran distribución geográfica y su manera de reproducción vegetativa ha originado gran variabilidad morfológica dentro de la especie (Maab, 1995).

### **2.2. Taxonomía del Ajo**

El ajo pertenece al género *Allium* y su nombre científico es *Allium sativum* L. *Allium* procede de la palabra *All* cuyo significado es “ardiente o caliente” y la palabra *sativum* proviene del latín significando “cultivado” (García y Sánchez, 2000). La taxonomía por primera vez fue descrita por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum*, sin embargo a la fecha su posición taxonómica y los géneros relacionados han sido motivos de controversia (Frisch y Friesen, 2002). La

clasificación más reciente se basa en la secuenciación ribosomal de ADN agrupando 780 especies, 15 subgéneros y 56 secciones (Friesen *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de *Allium sativum* L.

<b>Ajo (<i>Allium sativum</i> L.)</b>	
Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Liliidae
Superorden	Lilianae
Orden	Amaryllidales
Familia	Alliaceae
Subfamilia	Allioideae
Tribu	Allieae
Género	Allium
Especie	Allium sativum

### **2.3. Descripción Bótanica de *Allium sativum* L.**

*Allium sativum* L. se distingue por ser una planta monocotiledónea, herbácea, bulbosa y bianual. Esta planta alcanza una altura de 30 a 100 cm y sus hojas se distinguen por ser planas, estrechas y largas (Ishibasi, *et al.*, 1987; Reveles, *et al.*, 2009).

#### **2.3.1. Hoja**

Las hojas están unidas al tallo y se caracterizan por ser delgadas distribuyéndose de forma alterna. Miden de uno a tres cm de ancho y de largo alcanzan los 20 a 50 cm. Las hoja se integran de una vaina y un limbo el cual tiene las características de ser

planas, acanaladas, largas, estrechas, con una nervadura central y terminando en punta. La vaina se distinguen por tener una forma cilíndrica y formar el falso tallo o pseudotallo corto y erecto. En ellas no se acumulan sustancias nutritivas, forman las túnicas, con una coloración diversa y su función es proteger a los bulbillos (García, 1998).

### **2.3.2. Tallo**

El tallo se distingue por ser blando, liso y esta constituido por las vainas de las hojas. Su parte basal es denominado disco y se integra por una masa cónica, tunicada que alcanzando la madurez se vuelve dura. En esta parte del tallo se encuentran los bulbillos. El tallo llega a medir 30 mm de diámetro y 5 mm de altura denominándose tallo verdadero y se encuentra subterráneo a partir de este crecen las hojas y nace la raíz (Reveles, *et al.*, 2009; García, 1998).

### **2.3.3. Raíz**

Presenta raíz fasciculada, su coloración es blanca y con ramificaciones limitadas. El enraizamiento se considera superficial estando por encima de los 40 cm de profundidad y en algunos casos llega a los 70 y 80 cm de longitud (García, 1998; Reveles, *et al.*, 2009).

### **2.3.4. Bulbo**

El bulbo se integra por el conjunto del disco, bulbillos y túnicas externas que lo envuelven caracterizándose por ser transparentes, membranosas que adquieren una tonalidad del blanco a rojizo o coloración purpura (Kamenetsky y Rabinowich, 2006). El bulbo es el lugar donde se acumula las sustancias nutritivas (García, 1998).

La bulberización es el proceso que inicia cuando las yemas axilares de las hojas se hipertrofian formando los bulbillos comúnmente denominados dientes de ajo y estos

están rodeados de túnicas internas denominadas catáfilas. El tamaño, número y la forma de los bulbillos dependerá del cultivar que pertenece. Para que inicie la etapa de bulberización es necesario que el cultivo tenga cierto número de horas frío y tenga fotoperíodo largos con temperaturas que oscilen entre 18 y 20 °C (Messiaen, 1974).

### **2.3.5. Bulbillos o Dientes**

Los bulbillos se integran por hojas de protección las cuales carecen de lámina foliar. Cada uno de los dientes tiene una cubierta protectora cilíndrica esta hoja es de almacenamiento y posee una pequeña yema. Las hojas de reserva o de almacenamiento integran más del 85 % del peso del bulbo. Las reservas las emplea para la brotación de un nuevo ejemplar. Cada bulbillo es considerado un bulbo en potencia al carecer de semilla botánica es la forma tradicional de propagarse (Choudhury, 1967; Aiyer, 1954).

### **2.3.6. Escapo Floral**

El escapo floral está dispuesta en umbela y se genera a partir de la yema terminal del disco basal, se integra por seis pétalos, seis estambres, ovario coronado, estilo filiforme y estigma. La coloración es rosada o verde, tiene un pedicelo largo y la umbela alcanza entre los 7 y 10 cm de largo. *Allium sativum* se caracteriza por no producir semilla y esto se debe a que algunas variedades la secuencia del desarrollo durante o después de la meiosis es interrumpida y como consecuencia sus flores abortan (Brewster y Rabinowith, 1990).

## **2.4. Principales Usos de *Allium sativum* L.**

El ajo es un cultivo de importancia económica y es demandada por la sociedad gracias a sus propiedades nutritivas y al contenido de aminoácidos, minerales, vitaminas, ácido fólico, ácido pantoténico y niacina. Es enriquecido por algunos

componentes azufrados como alicina, aliina, alixina, alil metano, tiosulfinato, dialil disulfuro, adenosina entre otros. El valor nutricional, su sabor único y su peculiar aroma han logrado que su principal uso sea con fines culinarios, seguidas por el área agroindustrial y medicinal (D. Luis y R. Aller, 2008; Olmedo, 2010; Metwally *et al.*, 2012). El consumo del ajo principalmente es en fresco o deshidratado. Los bulbos reciben un proceso industrial y como resultado se obtienen productos en diferentes presentaciones como son polvos, tabletas o aceites (Espín y Tomás-Barberán, 2005). El ajo es usado principalmente como un condimento para la preparación de diversos platillos, su sabor único lo hace caracterizarse por ser un condimento insustituible en la cocina Mexicana, Centroamericana y Sudamericana (Charles, 2013). Las propiedades benéficas que proporciona a la salud han ocasionado que la demanda mundial del ajo se haya incrementado considerablemente en los últimos 10 años (FAOSTAT, 2014).

#### **2.4.1. Propiedades Medicinales**

*Allium sativum* L. proporciona múltiples beneficios a la salud humana. Se han realizado diversos estudios y los resultados han sido favorables en diferentes enfermedades cardiovasculares y en cánceres. También es usado como antioxidante, reductor de lípidos y a mostrado efectos antimicrobianos y antifúngicos (Keusgen, 2002; Singh y Sinhg, 2008; Ramirez-Concepción *et al.*, 2016).

Existen estudios *in vitro* realizado en células amnióticas humanas donde se observó como disminuyó la producción de radicales libres. La S-alil-cisteína y alicina son los componentes del ajo que tienen un gran efecto antioxidante, el resultado benéfico depende de dos factores la dosis y el tiempo que sea aplicado (Navarro, 2007; López, 2007).

#### **2.4.2. Propiedades Antimicrobianas**

El contenido de sulfatos del ajo como la alicina proporciona un amplio espectro de la actividad antimicrobiana siendo efectivo y menos nocivo al ambiente contra bacterias gram positivas y gram negativas. Por mencionar algunas encontramos *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Mycobacterium* (Ledezma y Aptiz, 1998).

#### **2.4.3. Propiedades Antifúngicas**

Se distingue también por ser eficaz al poseer propiedades antifúngicas debido a que ciertos hongos han mostrado tener sensibilidad a los compuestos que tiene el ajo principalmente la alicina. Los extractos de ajo disminuye el oxígeno por lo tanto reduce el crecimiento del organismo e inhibe la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos ocasionando daño a la membrana de ciertos hongos: *Cándida*, *Torulopsis*, *Trichophyton*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Aspergillus niger*, *C. albicans* y *Paracoccidiode* (Ghannoum *et al.*, 2004).

Se ha reportado que al combinar ajo con otros extractos en el cultivo de tomate orgánico ayuda a retardar la aparición de *Phytophthora infestans* atribuyendo a la inhibición de formar esporas (Diniz *et al.*, 2006).

### **2.5. Importancia Económica de *Allium sativum* L.**

A nivel mundial el ajo ocupa el 2° lugar dentro de las especies del género *Allium* después de la cebolla (*Allium cepa* L.) (FAOSTAT, 2012). Reportándose una producción anual de 11.79 millones de toneladas de ajo. China es el país líder en producir ajo alcanzando un 74 % con una producción total de 19,984,724 t, el segundo lugar India con 1,252,000 t, seguido por Corea con 353,761 t, y posteriormente Egipto, Rusia, Ucrania, España y Estados Unidos (FAOSTAT, 2014)

México en el 2016 alcanzó una producción de 75,266 toneladas (SIAP, 2016). Los principales estados productores de ajo son Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California, Aguascalientes y Sonora, (Ochoa *et al.*, 2012; Calderón, 2013). Aportando el 87.1 % de la producción nacional (SAGARPA, 2017).

Cuadro 2. Producción de los principales estados productores de ajo en México.

N°	Estado	Producción (t)
1	Zacatecas	42,340
2	Guanajuato	12,586
3	Puebla	3,969
4	Baja California	3,682
5	Sonora	2,969
6	Aguascalientes	1,754
7	Nuevo León	1,248

SIAP, 2016

Veracruz, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Durango, San Luís Potosí, Hidalgo, Guerrero, Jalisco, Tlaxcala, Baja California Sur, Coahuila y Michoacán son estados que también producen ajo en menor escala, sin embargo en el 2016 tuvieron un incremento considerable en su producción (SAGARPA, 2017). A pesar de ser un cultivo con gran demanda internacional y nacionalmente se ha reportado reducciones significativas originadas por enfermedades virales que afectan directamente la calidad y el rendimiento del cultivo (Conci *et al.*, 2003; Cafrune *et al.*, 2006).

## **2.6. Consumo y Principales Usos en México del Cultivo *Allium sativum* L.**

En México el ajo es una hortaliza muy apreciada y usada generalmente como condimento en la cocina para la elaboración de platillos típicos. En nuestro país se estima un consumo anual *per cápita* de aproximadamente 460 gr (Macías y Maciel,

2015). El 82 % es consumido en fresco y un 18 % recibe un procesamiento industrial para la producción de aceite, polvos, extractos y fármacos debido a sus propiedades benéficas que brinda a la salud humana (Burba, 2008).

En nuestro país el ajo es un cultivo que tiene importancia económica por su alta demanda en el comercio nacional y exterior. En el 2016 se alcanzaron ventas por 21.3 millones de dólares comercializándose en 13 países, principalmente Estados Unidos, Australia, Brasil, Francia y Martinica representando el 98.9 % de las ventas al exterior (SAGARPA, 2016). Sin embargo la producción del cultivo se ha reducido a un 20 % a consecuencia de las infecciones virales que han tenido una relevancia elevada en la región del Bajío mexicano (Pérez *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 2004; Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2006).

### **2.7. El Cultivo de *Allium sativum* en Nuevo León**

Nuevo León hoy en día es considerado un estado productor en potencia que busca en un futuro competir con los principales estados productores y esto se debe a que los últimos años a tenido incrementos considerables en su producción.

Existe alrededor de 100 productores que cultivan ajo y son más de 300 ha de las variedades Don Fermín y Tigre. El uso principal que se le asigna al ajo es para consumo y venderlo como semilla comercializándose en los estados de la república Mexicana y se a logrado exportar a Brasil y Argentina (SAGARPA, 2017)

Las variedades Don Fermin y Tigre han presentado tener una elevada resistencia a la sequía y altos rendimientos, aunado a esto sus bajos costos de producción han logrado que cada año incremente el número de productores y hectáreas sembradas. La variedad Don Fermín y Tigre se han popularizado por la región y son vendidas como semilla en los estados de Zacatecas y Aguascalientes. Los principales

municipios que concentran la mayor parte de la producción son Aramberri con alrededor de 200 ha, Galeana con 100 ha seguido por Cadereyta y Santiago N.L. (SAGARPA, 2017). A pesar de los incrementos que se ha registrado en los últimos años es importante mencionar que la producción puede verse amenazada si se presenta problemas fitopatológicos en el cultivo. Principales Virus que Afectan el Cultivo de Ajo

Entre los patógenos que ocasionan daños severos al cultivo de ajo se encuentran los virus responsables de producir enfermedades sistémicas (Lunello *et al.*, 2007). No existe un método de control químico contra los virus directamente (Walkey *et al.*, 1987).

La propagación asexual o vegetativa del ajo afecta al cultivo debido a la transmisión de los virus y esto es consecuencia del uso de semilla contaminada (Ramirez-Malagon *et al.*, 2006). Los virus se acumulan dentro de los tejidos de los bulbos y son propagados durante cada ciclo, es decir van de generación en generación (Fajardo *et al.*, 2001). Sin embargo también son transmitidos por organismos vectores como los nematodos, ácaros y áfidos (Wang *et al.*, 2009; Gvozdanovic-Varga *et al.*, 2009). Se han realizado estudios dónde se concluye que la mayor parte del cultivo es infectado por más de un virus denominado complejos virales. Los complejos virales no causan la muerte de la planta pero si son responsables de ocasionar severas pérdidas en rendimiento y la calidad del cultivo, siendo el principal factor que limita la producción (Klukackova *et al.*, 2007; Guillén *et al.*, 2011) (Figura 1).

El complejo viral que afecta al cultivo del ajo se integra por más de ocho especies de los géneros: Potyvirus, Carlavirus y Allexivirus, caracterizándose por ser los responsables de originar la enfermedad denominada el mosaico del ajo (Dovas y

Volvas, 2003; Cafrune *et al.*, 2005). El complejo viral reduce los rendimientos hasta un 50 % y afecta el peso de los bulbos hasta de un 88 % (Canavelli *et al.*, 1998; Lot *et al.*, 1998; Conci *et al.*, 2003). El mosaico del ajo se caracteriza por las coloraciones cloróticas en sus hojas, sin embargo la sintomatología varía de acuerdo al virus que se presenten en la planta (Van Dijk, 1993).

Los virus detectados principalmente en *Allium sativum* L. son los Potyvirus integrado por el virus del enanismo amarillo de la cebolla (Onion yellow dwarf virus: OYDV) y virus rayado amarillo del puerro (Leek yellow stripe virus: LYSV). Siendo los primeros en ser caracterizados en plantas del género *Allium* (Melhus *et al.*, 1929). OYDV y LYSV mundialmente se consideran los más importantes debido a la gran distribución de especies y ser responsables de grandes pérdidas reflejadas en el rendimiento (Klukáková *et al.*, 2007; Bagi *et al.*, 2012). Del género Carlavirus encontramos el virus latente del shallot (Shallot latent virus: VLS) y el virus latente común del ajo (Garlic common latent virus: GarCLV). Aún no se determina las pérdidas en rendimiento que ocasionan estos virus sin embargo no son tan severas cuando el cultivo es infectado por un potyvirus y un carlavirus haciendo una sinergia y causando pérdidas significativas (Sako, 1989; Perotto *et al.*, 2010).

Finalmente del género Allexivirus se consideran varias especies (GarV-A,B,C,D Y X). A nivel mundial los virus que integran la enfermedad denominada el mosaico del ajo son los más extendidos y de mayor importancia del género *Allium* (Cafrune *et al.*, 2006).

### **2.7.1. Virus del Enanismo Amarillo de la Cebolla (OYDV)**

A nivel mundial el OYDV es considerado el más importante en las especies del género *Allium* y es gracias a su amplia distribución. El OYDV pertenece al género

*potyvirus*, familia Potyviridae y es responsable de causar grandes pérdidas económicas en el rendimiento seguido por el LYSV (Chen *et al.*, 2001; Lunello *et al.*, 2007; Mahmoud *et al.*, 2008). En plantas del género *Allium* infectadas del virus se ha registrado en Europa un 52 % y un 86 % en Asia. Sin embargo cuando la infección de las plantas se combina con los potyvirus OYDV y LYSV causa mayores reducciones en el crecimiento y peso de los bulbos a un 84 % dependiendo del cultivar y este puede incrementar a un 91 % si la infección se mantiene durante algunos años (Lot *et al.*, 1998; Conci *et al.*, 2002)

En Estados Unidos se describió por primera vez en el género *Allium* específicamente en el cultivo de la cebolla (Melhus *et al.*, 1929), y el primer diagnóstico fue basado solamente por la sintomatología que presentaban las plantas (Bos, 1983; Walkey, 1990).

Dovas *et al.*, (2001) reportaron que el OYDV causa daños principalmente al follaje y bulbos teniendo reducciones significativas en peso y tamaño desde un 24 a un 60 % dependiendo del cultivar y la cepa del virus (Lot *et al.*, 1998). Algunos síntomas provocados por el virus son rayas amarillas y cloróticas en el haz de las hojas, pueden presentar un par de líneas amarillas o en las hojas completas. Las hojas se doblan provocando apariencia de enanismo y los bulbos no alcanzan su tamaño completo (Van Dijk, 1993; Dena, 1997). Este virus es transmitido por más de 50 especies de áfidos (Bos, 1981), sin embargo también puede contaminarse y diseminarse al cultivo por daños mecánicos (Diekmann, 1997) y por semilla (King *et al.*, 2011). OYDV se constituye por un genoma de una sola cadena de ARN y tiene una capsida de 30-47 kDa de peso molecular (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Se

caracteriza por ser un virus filamentoso y flexible con una longitud de 772-823 nm su punto de inactivación térmica es a los 50-60 °C (Katis *et al.*, 2012).

En Estados Unidos y Europa los índices más altos de propagación del virus se registran en primavera y verano llegando a la conclusión que son las épocas más altas de poblaciones de áfidos inmigrantes (Van Dijk, 1994).



Figura 1. a) Plantas de *Allium sativum* L. asintomáticas con una producción de bulbos de excelente calidad y de un tamaño considerable, b) Plantas con síntomas de clorosis en el haz de las hojas y su cosecha son bulbos con reducciones en peso y tamaño.

### 2.7.2. Virus Rayado Amarillo del Puerro (LYSV)

El LYSV Infecta algunas especies del género *Allium* entre ellas encontramos el ajo, ajo elefante, puerro y algunas especies ornamentales (Dovas *et al.*, 2001). El chalote es una especie inmune a este virus, la cebolla es poco común que se infecte a diferencia del ajo silvestre el cuál es muy susceptible (Lunello *et al.*, 2001).

En 1987 se registra por primera vez el LYSV en *Allium sativum* L. (Walkey *et al.*, 1987), en la actualidad se reporta una distribución amplia en los países productores de ajo (Conci *et al.*, 2002). Los síntomas van a depender principalmente de dos factores: la cepa del virus y el origen genético de la especie (Van Dijk, 1994).

Los principales síntomas que se observa es desde la germinación y posteriormente en sus hojas las cuáles presentan mosaicos, son evidentes las reducciones significativas en la altura de las plantas, y el tamaño de los bulbos teniendo como

resultado rendimientos decrecientes (Lunello *et al.*,1999). Se ha identificado a los pulgones como vectores responsables de infectar las plantas (Conci *et al.*, 2002).

El LYSV se caracteriza por ser un virus filamentoso y flexible con una longitud de 820 nm, teniendo su punto de inactivación térmica a los 50-60 °C (Chen *et al.*, 2002).

### **2.7.3. Virus Latente del Shallot (VLS)**

El VLS es el primer Carlavirus que fue detectado en especies de *Allium* especificando en plantas del chalote y posteriormente en ajo (Bos *et al.*,1978). El VLS son transmitidos por pulgones y aparentemente no presenta síntomas en los cultivos del ajo, cebolla y chalote pero en el momento que hace una sinergia con un potyvirus puede presentarse síntomas como rayas cloróticas en las hojas (Paludan, 1980). El VLS se caracteriza por ser flexible y filamentoso midiendo 650 nm de longitud (Bos *et al.*, 1978).

### **2.7.4. Virus Latente Común del Ajo (GarCLV)**

El GarCLV fue descrito por primera vez en Francia y posteriormente en Alemania (Delecalle y Lot, 1981; Graichen y Leistner, 1987). El virus afecta a especies del género *Allium* principalmente al ajo, puerro, cebolla y otras 50 especies más (Van Dijk, 1993).

GarCLV se constituye por un genoma linear de ARN de simple banda, monocatenario con un tamaño de 8-9 Kb, carecen de envoltura y miden de 470-1000 nm o más de longitud y su diámetro es de 12-13 nm (Instituto Suizo de Bioinformática, 2008).

Se transmite por ácaros los cuáles son responsables de ocasionar lesiones necróticas y los síntomas varían dependiendo el cultivar (Dena, 1997).

El GarCLV puede llegar ocasionar grandes daños al cultivo sin embargo es menos severo que el OYDV, (Salomón, 2002).

#### **2.7.5. GarV-A,B,C,D Y X**

En 1990 se reportó que un alto porcentaje de especies del género *Allium* era infectado por ácaros integrando un nuevo grupo de virus el cuál fue denominado con letras Garlic virus-A, B, C, D, E, X (GarV-A, B, C, D, E, X) (Van Dijk *et al.*, 1991; Vishnichenko *et al.*, 1993; Conci *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001 ). Se caracterizan por ser virus filamentosos y muy flexibles causando síntomas muy leves en comparación con otros virus. Su importancia económica al día de hoy se desconoce y esto se debe a que causa infecciones latentes siendo su impacto limitado, sin embargo en algunos casos si pueden tener un daño significativo en el cultivo (Van Dijk y Van der Vlugt, 1994).

La importancia de este virus radica en el efecto sinérgico que existe con plantas infectadas con múltiples Carlavirus y Potyvirus dando como resultado grandes pérdidas en el rendimiento. Estudios han reportado que el rendimiento disminuye rápidamente cuando el cultivo es infectado por un Allexivirus y luego reinfectado por otro virus (Perotto *et al.*, 2010)

### **2.8. Propagación Tradicional**

La mayoría de las especies del género *Allium* se propagan vegetativamente mediante los bulbillos, estolones y por división de rizomas (Kamenetsky y Rabinowitch, 2006). El ajo se caracteriza por tener reproducción agámica y no disponer de semilla botánica (Pardo *et al.*, 2011) siendo su propagación mediante el

uso de bulbillos los cuáles son obtenidos de cosechas de ciclos anteriores (Izquierdo,2006; Metwally *et al.*, 2012).

### **2.8.1. Desventajas de la Propagación Tradicional**

La principal desventaja del sistema de propagación vegetativo son los bulbillos, debido a que llevan la acumulación de enfermedades sistémicas originadas por hongos, bacterias y virus diseminándose al resto del cultivo y dando como resultado pérdidas relevantes en rendimientos y la calidad del cultivo se ve deteriorada (Davis, 1995; Alvarado *et al.*,2001). La falta de programas fitosanitarios y el desconocimiento de las parcelas donde proviene los bulbillos han ocasionado que su producción se reduzca significativamente complicando la producción de semilla certificada y como resultado reducciones en la producción y baja calidad de bulbos además de originar problemas fitopatológicos (Pardo y Marín, 2003; Pardo *et al.*, 2011; Parrano *et al.*, 2012).

### **2.9.Importancia del Cultivo de Tejidos Vegetales**

La biotecnología vegetal en los últimos años se ha convertido en una estrategia viable para la agricultura y la vida humana, esto es gracias a los grandes avances y contribuciones realizadas. Una de las ramas que nos ofrece la biotecnología es el cultivo *in vitro* denominado cultivo de tejidos vegetales ó micropropagación siendo considerada una herramienta vital. El cultivo de tejidos se debe principalmente a la capacidad que tienen las células vegetales, protoplastos u órganos para regenerar una planta denominado totipotencia (De Filippis, 2014). El cultivo de tejidos se debe realizar bajo condiciones adecuadas de asepsia y en un medio artificial químicamente definido incubándose en condiciones ambientales controladas (Mroginski *et al*, 2010).

Los países considerados más importantes en la producción de cultivos de tejidos son Estados Unidos, Japón, Israel, Italia, Francia, España, Bélgica, Reino Unido, India y Sudáfrica (De Filippis, 1999). Esto se debe a la importancia de producir cultivos alimentarios de alta calidad para ser exportados. Al usar la técnica de micropropagación nos permite eliminar patógenos y alcanzar una rápida tasa de multiplicación (Jain y Brar, 2010).

### **2.9.1. Aplicación del Cultivo de Tejidos Vegetal**

El cultivo *in vitro* ofrece diversas aplicaciones de importancia por mencionar algunas encontramos el mejoramiento y transformación genética las cuáles inician con el cultivo de tejidos (Murphy, 2007; Chawla, 2009). Permite la obtención de metabolitos secundarios con la finalidad de obtener productos bioquímicos vegetales y farmacéuticos. Otras aplicaciones es el preservar especies en peligro de extinción y nos ofrece un banco de germoplasma. Nos permite realizar la propagación de especies vegetales que llegan a tener cierto grado de dificultad al ser propagados mediante los métodos convencionales, así mismo llegar a tener producciones masivas de cultivos de interés económico. A través del cultivo de tejidos nos permite el saneamiento vegetal es decir material vegetal libre de enfermedades (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006; De Filippis, 2012).

### **2.10. Factores que Intervienen en el Cultivo de Tejidos**

Existen factores que intervienen en la regeneración de las plántulas *in vitro*. Uno de los requerimientos esenciales es trabajar bajo condiciones de asepsia es decir se requiere de un ambiente estéril, artificial y controlado.

### **2.10.1. Explante**

Es importante considerar la fuente de explante inicial para el desarrollo de la especie *in vitro* procedente de una planta elite. El cultivo de tejidos nos permite trabajar con los protoplastos, callo, tejido meristemático, órganos y embriones (Chawla, 2009; Neuman y Kumar, 2009).

Es recomendable usar los ápices terminales y segmentos uninodales de ramas jóvenes siendo excelentes explantes para la brotación. Si se requiere hacer uso de la embriogénesis somática se debe usar embriones zigóticos inmaduros u hojas para inducir callo. También se puede hacer uso de ovarios u óvulos fecundados. Si la finalidad es obtener plantas haploides los explantes más utilizados son las anteras (Mroginski *et al*, 2010).

### **2.10.2. Contaminación Microbiana**

Es recomendable que las plantas donadoras denominadas madres ó elites crezcan en condiciones de invernadero con la finalidad de reducir las tasa de contaminación al momento de realizar el establecimiento *in vitro* (Mroginski *et al*, 2010).

## **2.11. Medio de Cultivo**

El éxito del cultivo de tejidos depende de gran medida del medio de cultivo ó medio nutritivo adecuado para cada una de las etapas de la micropropagación *in vitro*. El crecimiento, desarrollo y la morfogénesis del explante se debe principalmente a la composición química del medio nutritivo, es decir se requiere proporcionar al explante los elementos minerales que integran los nutrientes inorgánicos: macronutrientes (potasio, calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre) y micronutrientes (hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno) siendo los minerales esenciales que las plantas requieren.

Es importante adicionar al medio nutritivo constituyentes orgánicos como vitaminas (tiamina, ácido nicotínico y piridoxina) aminoácidos (glicina, mio-inositol y L-glutamina) y una fuente de carbono (sacarosa) (Bhojwani y Dantu, 2013).

El medio basal es enriquecido con los reguladores de crecimiento, sin embargo algunos de los explantes pueden tener endógenamente hormonas de crecimiento naturales y es necesario complementar con los reguladores de crecimiento sintetizados exógenamente. La selección del regulador de crecimiento y la cantidad depende de la especie, variedad, tipo de explante y la etapa de cultivo es decir si se requiere inducir la diferenciación, multiplicación, elongación o enraizamiento de los brotes.

#### **2.11.1. Tamaño de Explante**

Es importante considerar el tamaño del explante entre más grande sea este, existe mayor riesgo que se contamine con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante que debe usarse el cual depende principalmente de la especie y del material vegetal (Mroginski *et al*, 2010).

#### **2.11.2. Edad Fisiológica**

En el cultivo *in vitro* la mejor respuesta se obtiene de explantes jóvenes e indiferenciados. Por esa razón el hacer uso de los meristemos apicales y axilares tiene mayor demanda en numerosas especies, en especies leñosas se considera la edad fisiológica como un factor crítico para su establecimiento. Existe más probabilidad que la micropropagación sea exitosa cuando se hace uso de explantes jóvenes a diferencia de usar los tejidos maduros los cuales representan un porcentaje más alto de contaminación (Mroginski *et al*, 2010)

## **2.12. Importancia de la Micropropagación *in vitro***

La micropropagación se define como la multiplicación de individuos genéticamente idénticos mediante la regeneración de tejidos u órganos somáticos de cultivos de interés (Bhojwani y Dantu, 2013). Principalmente es utilizada para preservar los caracteres de genotipos seleccionados o cultivares que tienen importancia económica. Se puede lograr gracias a la totipotencia que poseen las células vegetales lo cuál permite la regeneración de especies a partir de pequeños tejidos somáticos (Murashige, 1974). La micropropagación se distingue por ser una alternativa potencial que nos ofrece un método de propagación clonal masivo en un corto tiempo y en espacios reducidos, convirtiéndose en una tecnología industrial utilizada en todo el mundo para propagar especies forestales, ornamentales, frutales y leñosas (George *et al*, 2008; Yam y Arditti, 2009)

### **2.12.1. Ventajas de la Micropropagación *in vitro***

Las principales ventajas que nos ofrece la micropropagación comparado con los métodos tradicionales es que se puede producir un gran número de plantas en espacios pequeños y en periodos más cortos. Es importante mencionar que la regeneración es más rápido debido a que se proporciona condiciones controladas de temperatura, horas luz y de oscuridad así como los medios químicamente definidos en los cuales se manipula la cantidad de los nutrientes y reguladores de crecimiento. Otra de las ventajas es que se requiere de pequeñas proporciones de tejido vegetal para iniciar el establecimiento aséptico. Es posible propagar genotipos que con los métodos tradicionales presentan cierto grado de dificultad y el trabajar en condiciones asépticas nos permite obtener material vegetativo sano libre de

enfermedades. Otra de las ventajas es que gracias a la micropropagación es posible producir plantas en cualquier época del año (Bhojwani y Dantu, 2013).

### 2.12.2. Etapas de la Micropropagación *in vitro*

La micropropagación comprende de cinco etapas y cada una de ellas debe cumplir con ciertos requerimientos necesarios:

Etapla 0: Proveer explantes de calidad obtenidos de una planta elite.

Etapla 1: Establecimiento aséptico de explantes.

Etapla 2: Multiplicación o proliferación de brotes.

Etapla 3: Enraizamiento de los brotes obtenidos *in vitro*.

Etapla 4: Aclimatación de las plántulas regeneradas *in vitro* (Bhojwani y Razdan, 1996), (Figura 2).

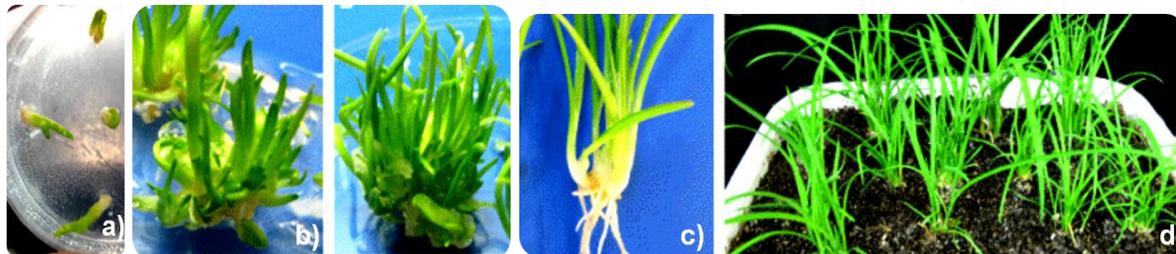


Figura 2. Cuatro etapas de la micropropagación a) Establecimiento aséptico *in vitro*, b) Proliferación de brotes, c) Enraizamiento de plántulas regeneradas *in vitro*, e) Etapa de aclimatación de las plántulas *ex vitro*.

#### 2.12.2.1 Etapa 0. Preparación del material vegetal

El éxito del establecimiento de explantes depende principalmente de la preparación previa del material vegetal. La contaminación es uno de los problemas más serios en el establecimiento *in vitro*, es por eso que se busca que la planta madre cumpla con los requerimientos de calidad, higiene y fisiológicos. Las plantas madres que son mantenidas en invernadero se reporta que son las plantas que mejor respuesta

tienen en relación a la asepsia. Existen factores que influyen en la calidad de los explantes siendo uno de ellos el tipo de órgano que se use como fuente de explante, así como la edad ontogénica y fisiológica. Otros factores que se deben considerar son la temporada cuando se hace la colecta del material vegetal, el tamaño y principalmente el estado sanitario que se encuentre la planta madre (Olmos *et al.*, 2010). Es necesario realizar un control preventivo usando métodos de verificación de patógenos, seleccionando el material vegetal de especies vigorosas que no muestren signos de enfermedades o patógenos (Cassells, 2011)

#### **2.12.2.2 Etapa 1. Establecimiento *in vitro***

El éxito del establecimiento aséptico depende de diversos factores, entre ellos la elección del explante es importante y se debe elegir dependiendo la vía de regeneración y multiplicación que se utilice. La yema apical se distingue por ser el explante más utilizado seguido por los segmentos nodales con yemas axilares sin embargo también se puede hacer uso de la organogénesis indirecta usando como fuente de explante raíz, hoja y tallo (Cardoza y D'souza, 2000). La esterilización adecuada o los procesos de desinfección que son sometidos los explantes así como los métodos de prevención de reacciones de hipersensibilidad son de importancia en esta etapa (Olmos *et al.*, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013). Es importante considerar que en algunos casos se encuentra la presencia de patógenos endógenos los cuales se pueden controlar haciendo uso de bacteriostáticos o antibióticos añadidos al medio de cultivo (Olmos *et al.*, 2010; Cassells, 2011). Dependiendo de la especie algunos explantes al ser inoculados en los medios de cultivos liberan fenoles

causando oxidación y oscurecimiento de los medios los cuales pueden llegar a ser tóxicos para los explantes (Bhojwani y Dantu, 2013).

### **2.12.2.3 Etapa 2. Multiplicación**

El éxito de la micropropagación se debe a la eficiencia de la etapa de multiplicación integrándose de dos fases: la inducción y la multiplicación. La inducción es la desdiferenciación del tejido mediante las concentraciones de reguladores de crecimiento. Empleando un balance óptimo de citocininas y auxinas siendo las responsables de inducir la desdiferenciación y posteriormente la multiplicación celular (Olmos *et al.*, 2010).

La proliferación de brotes se puede lograr mediante tres vías: la regeneración de callo, formación de brotes directamente del explante ó induciendo la ramificación axilar. En la regeneración de callo las células vegetales tienen la capacidad de formar una masa de células dando las condiciones de cultivo adecuadas. El callo es inducido por el balance hormonal adecuado y es posible regenerar una planta mediante la organogénesis indirecta o la embriogénesis (Dutta e Ibaraki, 2006; Etienne *et al.*, 2006).

La ramificación axilar se logra con el uso adecuado de citocininas obligando a los brotes axilares a crecer. El regenerar plantas por esta vía a sido exitosa y explotada considerándose el método más utilizado para propagar plantas de interés económico produciendo gran cantidad de brotes a partir de un único explante. Es el método de propagación clonal *in vitro* que se distingue por ser el más preferido y confiable en la uniformidad genética de plantas micropropagadas. Es necesario hacer subcultivos periódicamente de 3 a 4 semanas debido al gradual agotamiento de los nutrientes y

reguladores de crecimiento en el medio de cultivo este proceso se puede repetir varias veces (Bhojwani y Dantu, 2013).

El principal objetivo que tiene esta etapa es conseguir el mayor número de brotes mediante subcultivos sucesivos con la finalidad llevar esos brotes a la siguiente etapa (Olmos *et al.*, 2010).

#### **2.12.2.4 Etapa 3. Enlongación y enraizamiento**

Los brotes que son regenerados a partir de callo, yemas adventicas y ramificación axilar requieren de la etapa de enraizamiento para producir raíces adventicias de los brotes obtenidos y de esta manera tendríamos regenerada una planta completa *in vitro*. En esta etapa también se induce la elongación de los explantes haciendo uso de un nivel reducido de citocininas y posteriormente el enraizamiento se da en medios de cultivo suplementado con una auxina. En enraizamiento representa un 70 % del costo de las plantas propagadas *in vitro* por consiguiente el porcentaje de plantas con raíz debe ser alto alcanzando el 95 %. Para reducir costos en ocasiones se recurre al enraizamiento *ex vitro* haciendo uso de sustratos esteriles como perlita, turba o vermiculita (Olmos *et al.*, 2010). La principal ventaja del enraizamiento *ex vitro* es menos probable hacer daño a la radícula en comparación con explantes *in vitro*, las raíces que se forman *in vitro* carecen de pelos radicales, cuando se realizan los trasplantes es común que las raíces se dañen durante el proceso (Iliev *et al.*, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013).

#### **2.12.2.5 Etapa 4. Aclimatación**

Las plantas regeneradas *in vitro* crecen en un ambiente artificial sufriendo de anomalías morfológicas, anatómicas, fisiológicas y citológicas. Por mencionar algunas encontramos que las plantas tienen una nutrición heterotrófica debido al medio químicamente definido el cuál es rico en nutrientes y agua. Otro factor es la humedad relativa alta en dónde crecen las plantas *in vitro* por consiguiente esto afecta la anatomía y morfología de la hoja (Iliev *et al.*, 2010). Se puede ver en el desarrollo de la cutícula, escasa cera, estomas grandes, poco desarrollo de cloroplastos y bajo contenido de clorofila (Preece y Sutter 1991; Bhojwani y Razdan 1996). La etapa de aclimatación es el éxito donde culmina la micropropagación, en esta etapa las plántulas *ex vitro* se establecen en suelo o sustrato y se les dan las condiciones óptimas para posteriormente ser llevadas a campo (Olmos *et al.*, 2010). Suttle (2011) menciona que la etapa de aclimatación debe ser de 4 a 6 semanas dependiendo la especie, el clima y el enraizamiento. Esta etapa es fundamental y debe realizarse antes de transplantar las plantas al campo. Durante la etapa de aclimatación las plantas comienzan a tener actividad fotosintética para volverse autotróficos. Las plántulas son capaces de sobrevivir cuando hay nuevas raíces y crecimiento de nuevas hojas (Bhojwani y Dantu, 2013).

#### **2.13. Cultivo *in vitro* de Meristemas**

Erradicar los virus de las plantas es un tema de interés que busca optimizar rendimientos y poder exportar cultivos a otros países (Bhojwani y Dantu, 2013).

La eliminación de virus requiere del uso especializado del cultivo *in vitro* de meristemas convirtiéndose en la técnica más utilizada para la producción de plantas de ajo libre de virus (Ghaemizadeh *et al.*, 2014). Esto se puede lograr debido a que los virus en las plantas tienen una distribución desigual en los tejidos vasculares y se encuentran ausentes en el área meristemática lugar donde se desdiferencia las células permitiéndonos obtener plantas libres de virus bajo condiciones asépticas (Grout, 1990; Sánchez, 1995; Pérez, 1998; Perotto *et al.*, 2010). La replicación del virus depende mucho del metabolismo de la planta huésped y la actividad metabólica que se da en las células meristemáticas no permite la replicación del virus (Bhojwani y Dantu, 2013).

El meristemo se convirtió en el explante ideal llegando a medir de 0.2-0.5 mm de longitud integrando el domo y un par de primordios foliares (Mroginski *et al.*, 2010). El tamaño del explante es crítico para el éxito del cultivo siendo un factor limitante por tener cierto grado de dificultad y no garantizar la obtención total de plantas libres de virus (Vieira *et al.*, 2015). Las plantas que son regeneradas mediante el cultivo de meristemas tienen otras ventajas entre ellas es menos variación somaclonal o mutaciones genéticas a diferencia que si se trabajará con la embriogénesis somática (Hirochika, 1993).

#### **2.14. La Termoterapia**

Un método viable de control sanitario es la termoterapia, su eficiencia y fácil aplicación actúa en la erradicación de bacterias, virus, hongos, nemátodos y fitoplasmas de cultivos de reproducción vegetativa. Aplicándose exitosamente en plantas leñosas en cultivos de vid, manzana, melocotones, pera, ciruela y en herbáceas principalmente en ajo, papa, crisantemo y caña de azúcar (Varés *et al.*,

2009; Panattoni *et al.*,2013). Las temperaturas y períodos prolongados de calor que se somete el material vegetal son de mayor utilidad para inactivar virus. Algunas especies al someterlas a temperaturas altas no sufren lesiones graves en las plantas huésped pero en otras puede ocasionar efectos negativos sobre la regeneración y supervivencia de las plantas (Perotto *et al.*, 2003; Ghaemizadeh *et al.*, 2014).

La termoterapia consiste en someter los explantes a temperaturas que oscilan de los 35 °C a los 54 °C en determinado tiempo sin olvidar que se debe considerar la tolerancia fisiológica de la especie. La temperatura ayuda a la degradación de los virus debido a que la sensibilidad de algunos es menor a la temperatura que puede tolerar la planta sin causar daños a los tejidos vegetales (Spiegel *et al.*,1993). Los tratamientos térmicos que han sido utilizados con mayor frecuencia es de temperaturas que oscilan los 35 y 38 °C. El estrés térmico al que se someten los explantes se relaciona con la ruptura del hidrógeno y disulfuro siendo los enlaces de la proteína que integra la capsida, posteriormente el ácido nucleico y los enlaces covalentes fosfodiéster logran la degradación del virus, alcanzando la inhibición de replicación (Panattoni *et al.*, 2013). Sin embargo el usar este método no nos garantiza que se eliminen todos los virus y se debe considerar que la mayoría de las plantas hospederas son termosensibles (Bhojwani y Dantu, 2013).

La termoterapia puede realizarse con calor húmedo o seco (aire caliente). El calor húmedo es efectivo en la eliminación de bacterias y hongos raramente se reportado en virus y en calor seco es más efectivo en la eliminación de virus (Hollings., 1965)

### **2.15. Prueba de Diagnóstico Serológico ELISA**

La prueba serológica ELISA es el principal método de diagnóstico para detección de virus a gran escala debido a que esta técnica se ve favorecida por ser un análisis

rápido y de fácil uso para procesar una gran cantidad de muestras y se distingue por ser el principal método de diagnóstico para las pruebas de *Allium*, sin embargo su detección es limitada, poco confiable y frecuentemente produce falsos negativos. (Koch y Salomon, 1994; Concí, 1997).

### **2.16. Técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR)**

El uso de la técnica de RT-PCR a sido utilizada de manera exitosa en la identificación de los virus que están presentes en plantas de ajo (Dovas *et al.*, 2001; Lunello *et al.*, 2005; Leisova-Svobodova y Karlova-Smekalova, 2011). Siendo un método confiable de indexación específica y eficaz para identificar los patógenos (Pérez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2010). Dovas *et al.*, (2001) se han encargado de optimizar los métodos de detección por medio de la técnica de PCR distinguiéndose por ser altamente sensible y por utilizarse a gran escala para detección del OYDV y LYSV. La técnica de RT-PCR es 10<sup>2</sup>-10<sup>4</sup> veces más sensible que DAS-ELISA detectando los virus del género *Allium*. La RT-PCR en tiempo real a logrado alcanzar altos niveles de sensibilidad de detección de virus 10<sup>6</sup> veces más que el DAS-ELISA (Lunello *et al.*, 2004). Dovas *et al.*, (2001) son los responsables de haber diseñado primers que han sido utilizados de manera eficiente amplificando el OYDV de los tejidos de hojas y bulbos por medio de RT-PCR, siendo una técnica que ha sido ya estandarizada para la detección del virus en ajo y cebolla (Arya *et al.*, 2006). Tambien se a utilizado con éxito la RT-PCR dúplex para detección de OYDV y SLV en hojas y en dientes de ajo infectados (Majudmer *et al.*, 2008). La RT-PCR múltiplex permite la realización de detección simultánea del VLS y cinco virus (Park *et al.*, 2005).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Localización del Experimento**

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetal y el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía en el Campus de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en el municipio de Escobedo N.L. Además del uso de las instalaciones del laboratorio Biociencia S.A. de C.V. ubicado en Monterrey, N.L. El experimento fué realizado en el periodo de julio 2016 a mayo de 2017.

#### **3.2. Material Vegetal**

El material biológico que se utilizó para la investigación fueron bulbos de ajo de los cultivares Don Fermín (DF) y Tigre (Tig). Los bulbos se seleccionaron de plantaciones que fueron cosechados en abril del 2016 del municipio de Aramberri, N.L. de la unidad Académica la Ascención de la Facultad de Agronomía.

#### **3.3. Condiciones Experimentales de Termoterapia**

Los bulbillos de ajo fueron colocados en frascos de vidrio, sellados y expuestos a tratamientos térmicos. El material vegetal fue colocado en una incubadora y baño maría bajo condiciones de calor húmedo y seco. El experimento se integró por 16 tratamientos mediante la combinación de dos cultivares DF y Tig, dos explantes (ápice y meristemo) los cuáles estuvieron bajo condiciones de dos niveles de temperatura (40 y 50 °C) y tres períodos de tiempo (20 d, 40 d y 1 h). Cada condición se integró por 10 repeticiones (Cuadro 4).

Cuadro 3. Condiciones experimentales de termoterapia con calor seco y húmedo.

Condición	Cultivar	Explante	Temperatura (C°)	Tiempo (d/h)
T1	DF	Ápice	-----	-----
T2	DF	Ápice	40	20 d
T3	DF	Ápice	40	40 d
T4	DF	Ápice	50	1 h
T5	DF	Meristemo	-----	-----
T6	DF	Meristemo	40	20 d
T7	DF	Meristemo	40	40 d
T8	DF	Meristemo	50	1 h
T9	Tig	Ápice	-----	-----
T10	Tig	Ápice	40	20 d
T11	Tig	Ápice	40	40 d
T12	Tig	Ápice	50	1 h
T13	Tig	Meristemo	-----	-----
T14	Tig	Meristemo	40	20 d
T15	Tig	Meristemo	40	40 d
T16	Tig	Meristemo	50	1 h

Los bulbillos sometidos a calor seco fueron colocados en una incubadora a una temperatura de 40 °C por 20 y 40 d. Uno de los cuatro tratamientos consistió en colocar los bulbillos en baño maría expuestos a calor húmedo a una temperatura de

50 °C/h (Figura 3). La temperatura y el tiempo fueron los efectos fijos a controlar en el experimento para eliminar el OYDV de los cultivares en estudio.

Las variables evaluadas de las condiciones que se consideraron en meristemos y ápices de la fase de termoterapia fueron: viabilidad de los explantes y crecimiento longitudinal.



Figura 3. Termoterapia. a) Incubadora (bulbillos expuestos a calor seco 40 °C por 20 y 40 d), b) Baño María (bulbillos sometidos a calor húmedo 50 °C por una hora).

### 3.4. Establecimiento *in vitro* de Meristemos y Ápices

La predesinfección del material vegetal consistió en eliminar la membrana protectora externa de los bulbillos y lavarlos en una solución jabonosa después fueron sumergidos en una solución fúngica-bactericida compuesta por Benomilo 1.5 gL<sup>-1</sup> y Oxitetraciclina 1.5 gL<sup>-1</sup> por un lapso de dos horas en constante movimiento.

Con la finalidad de eliminar los agentes superficiales los explantes fueron sometidos a un proceso de desinfección realizado en una campana de flujo lamina. Los bulbillos fueron sumergidos en etanol al 96 % durante 1 min y transferido a una solución de blanqueador comercial Cloralex® a una concentración del 40 % v/v (NaClO al 4.5 % P/V), adicionando 0.1 % de Tween-20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) por

un lapso de 20 min en agitación. Concluido el tratamiento de desinfección se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril y se dejó en reposo (Figura 4).



Figura 4. Proceso del establecimiento *in vitro* de *Allium sativum* L. a) Predesinfección de los bulbillos, b) Desinfección de los explantes con cloralex 40 v/v, c) Extracción del ápice y meristemas inoculados en medio de cultivo basal MS.

Los bulbillos se seccionaron transversalmente a la mitad, eliminándose las hojas envainadoras hasta llegar al ápice de un tamaño de 5-8 mm y al domo meristemático de 1-2 mm (Figura 5). Al concluir la siembra las unidades experimentales fueron incubadas en condiciones controladas de temperatura de  $26 \pm 2$  °C y fotoperiodo de

16 h luz y 8 h oscuridad. Los explantes fueron establecidos asépticamente en las sales básicas del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).



Figura 5. a) Corte longitudinal del bulbillo, b) Extracción del ápice caular de 3.0 cm de longitud, posteriormente 2.5 cm a 1 cm de longitud, c) Extracción del domo meristemático con dos primordios foliares midiendo 0.5 mm, d) Tejido meristemático de un tamaño menor a 1 mm.

### 3.5. Medios de Cultivos

En el desarrollo del protocolo de micropropagación se elaboraron medios nutritivos con citocininas en diferentes concentraciones donde los explantes fueron inoculados y posteriormente subcultivados dependiendo de la etapa que correspondía.

#### 3.5.1. Establecimiento *in vitro* de Ápices y Meristemas

En el medio de cultivo de establecimiento se utilizaron las sales básicas del MS adicionado con mio-inositol  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , glicina  $2.0 \text{ mgL}^{-1}$ , piridoxina  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$ , ácido nicotínico  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  y tiamina  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$ , añadiendo  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa y el pH fue ajustado a 5.7 con NaOH y HCl al 1.0 N. Se añadió  $8.0 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel y el medio nutritivo fue vertido en tubos de ensayo de 25x150 mm y en cajas petri dosificando a 20 ml por unidad experimental, finalmente el medio fue esterilizado en la autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  a 15 lb de presión por 15 min (Figura 6).

Al finalizar la siembra el material fue llevado al área de incubación y transcurrido los siete días se evaluó el % de asepsia y viabilidad de los explantes.



Figura 6. Proceso de elaboración del Medio Nutritivo MS.

### 3.5.2. Etapa de Inducción de Brotes

Los explantes obtenidos del establecimiento aséptico que presentaron viabilidad a los 14 d fueron subcultivados en dos medios de cultivo químicamente definidos integrado por las sales básicas del MS y LS (Linsmaier y Skoog, 1965). Los medios de cultivo se enriquecieron con vitaminas (piridoxina, ácido nicotínico, tiamina) y aminoácidos (glicina) con las respectivas dosis que corresponden a los medios MS y LS (Cuadro 5). Finalmente se añadió una citocinina 6-Bencilaminopurina (BAP) a concentración de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  (Cuadro 6). Como fuente de carbono se agregó  $30 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa, el pH fue ajustado a 5.7 y se añadió  $8.0 \text{ gL}^{-1}$  de agar gel. El medio nutritivo fue vertido en tubos de ensayo dosificado a 20 ml por unidad experimental y se esterilizó en la autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  a 15 lb de presión por un lapso de 15 min.

Transcurridos 14 días después del subcultivo la variable a evaluar fue el crecimiento longitudinal por explante.

Cuadro 4. Componentes de los medios basales MS y LS.

Grupo	Componente	MS	LS
		Cantidad mgL <sup>-1</sup>	Cantidad mgL <sup>-1</sup>
Nitratos	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900	1900
Sulfatos	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	370	370
	MnSO <sub>4</sub> • 4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3
	ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6
	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
Halogenuros	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	440	440
	KI	0.83	0.83
	CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
PBMo	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
NaFeEDTA	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3	37.3
	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8
Vitaminas	Tiamina	0.1	0.4
	Acido Nicotinico	0.5	0.0
	Piridoxina	0.5	0.0
	Mio-inositol	100	100
Aminoácidos	Glicina	2.0	0.0

Fuente: Beyl, 2011

†PBMo: compuestos de fósforo, boro y molibdeno

Cuadro 5. Tratamientos para inducir el crecimiento longitudinal de explantes subcultivados a 15 días del establecimiento *in vitro*.

<b>Tratamientos</b>	<b>Testigo</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
Medio	MS	MS	LS
<u>Vitaminas</u>			
Tiamina	0.1 mgL <sup>-1</sup>	0.1 mgL <sup>-1</sup>	0.4 mgL <sup>-1</sup>
Piridoxina	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.0 mgL <sup>-1</sup>
Ácido Níctotínico	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.0 mgL <sup>-1</sup>
Myo inositol	100 mgL <sup>-1</sup>	100 mgL <sup>-1</sup>	100 mgL <sup>-1</sup>
Glicina	2.0 mgL <sup>-1</sup>	2.0 mgL <sup>-1</sup>	0.0 mgL <sup>-1</sup>
<u>Citocinina</u>			
BAP	0.0 mgL <sup>-1</sup>	2.0 mgL <sup>-1</sup>	2.0 mgL <sup>-1</sup>

### 3.5.3. Etapa de Proliferación de Brotes *in vitro*

Los explantes viables obtenidos de la etapa de inducción fueron seccionados a un tamaño de 1.5 cm de largo con la finalidad de subcultivarlos en el medio nutritivo MS suplementados con vitaminas y las siguientes citocininas: 2-isopentenil-adenine (2-iP), Bencilaminopurina (BAP) y Kinetina (Kin) en dos concentraciones (0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>). Se ajustó el pH a 5.7 con NaOH y HCl al 1.0 N y finalmente se añadió 8.0 gL<sup>-1</sup> de agar gel. El medio nutritivo fue vertido en tubos de ensayo dosificado a 20 ml por unidad experimental, y esterilizados en la autoclave a 121 °C a 15 lb de presión por 15 min.

Al concluir la siembra los explantes fueron llevados al área de incubación a una temperatura de 26 ± 2 °C y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad (Figura 7).

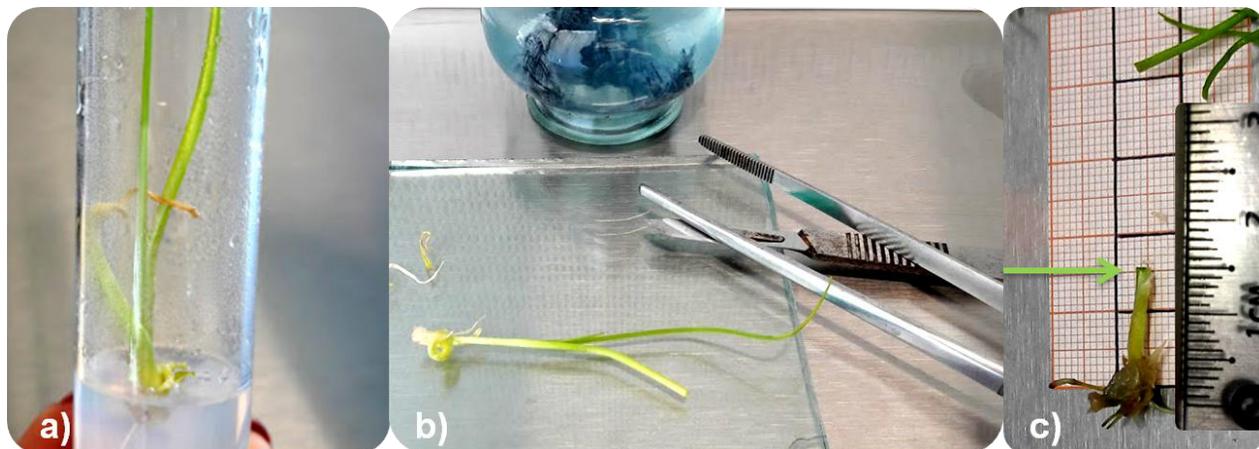


Figura 7. a) Plántula *in vitro* obtenida de la etapa de inducción de brotes, b) Plántula de ajo seccionada bajo condiciones estériles, c) Explante de un tamaño de 1.5 cm y posteriormente se subcultivarón en medios nutritivos para la etapa de proliferación de brotes.

#### 3.5.4. Enraizamiento de Brotes *in vitro*

Para inducir el crecimiento radicular de las plantúlas *in vitro* se mantuvieron en medios químicamente definidos suplementados con las siguientes citocinas: BAP, Kin y 2-iP en dos concentraciones (0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>). Las plantúlas regeneradas *in vitro* se dejaron 40 d para posteriormente evaluar la inducción y el crecimiento radicular.

### 3.6. Diseño Experimental

La primera fase fue establecida mediante un diseño completamente al azar integrada por 16 tratamientos mediante la combinación de dos cultivares de ajo (DF y Tig), dos explantes (ápice y meristemo) y las condiciones combinadas por dos niveles de temperatura (40 y 50 °C) y tres períodos de tiempo (20 d, 40 d y 1 h). Cada condición se integró por 10 repeticiones.

La segunda fase experimental fue la etapa de inducción de brotes analizada bajo un diseño completamente al azar donde se evaluaron dos medios de cultivo (MS y LS), un solo cultivar (DF) y la adición de la citocinina BAP a una concentración de 2.00

mgL<sup>-1</sup>. Se analizaron dos tratamientos y un testigo con 10 repeticiones. La variable a evaluar fue el crecimiento longitudinal de los explantes y se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias Tukey.

La tercera fase de la investigación fue evaluar la etapa de proliferación de brotes de las plántulas regeneradas *in vitro* libre de virus del OYDV. Se estableció bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2X2X2X2. Donde el factor A fueron dos cultivares (DF y Tig), factor B dos concentraciones (0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>) de 2-IP, factor C dos concentraciones de BAP (0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>) y el factor D se integró por Kin (0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>) con un total de 16 t. Los datos fueron analizados en dos tiempos (20, y 40 d) con siete repeticiones por tratamiento (Cuadro 7). Las variables analizadas en el estudio fueron número de brotes, crecimiento longitudinal y crecimiento radicular. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias Tukey si  $p$  es < a 0.05. Los datos fueron analizados en el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 21.

### **3.7. Análisis Serológico Elisa de los Bulbos de *Allium sativum* L.**

Se analizaron muestras compuestas de los bulbillos cosechados en abril del año 2016 del cultivar DF provenientes del municipio de Aramberri N.L. La finalidad fue detectar e identificar los virus presentes en el cultivo del ajo mediante la prueba serológica ELISA. Al realizar el análisis serológico se utilizaron anticuerpos comerciales de la compañía Agdia de los siguientes virus: virus de la mancha amarilla del iris (LYSV), virus del rayado amarillo del puerro (LYSV), virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV), virus del mosaico del pepino (CMV), virus

latente del chalote (SLV) y virus latente común del ajo (GarCLV). Fueron incluidos controles positivos y negativos.

La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Se consideraron muestras positivas aquellas que superaron el doble del promedio de dos lecturas de absorbancia del testigo negativo.

Cuadro 6. Tratamientos de la etapa de inducción y proliferación de brotes.

<b>Tratamientos</b>	<b>Factor A Cultivar</b>	<b>Factor B 2-iP mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Factor C BAP mgL<sup>-1</sup></b>	<b>Factor D KIN mgL<sup>-1</sup></b>
T1	Tig	0	0	0
T2	Tig	0	0	1.5
T3	Tig	1.5	0	0
T4	Tig	0	1.5	0
T5	Tig	1.5	1.5	0
T6	Tig	0	1.5	1.5
T7	Tig	1.5	0	1.5
T8	Tig	1.5	1.5	1.5
T9	DF	0	0	0
T10	DF	0	0	1.5
T11	DF	1.5	0	0
T12	DF	0	1.5	0
T13	DF	1.5	1.5	0
T14	DF	0	1.5	1.5
T15	DF	1.5	0	1.5
T16	DF	1.5	1.5	1.5

Evaluados a 20, y 40 d.

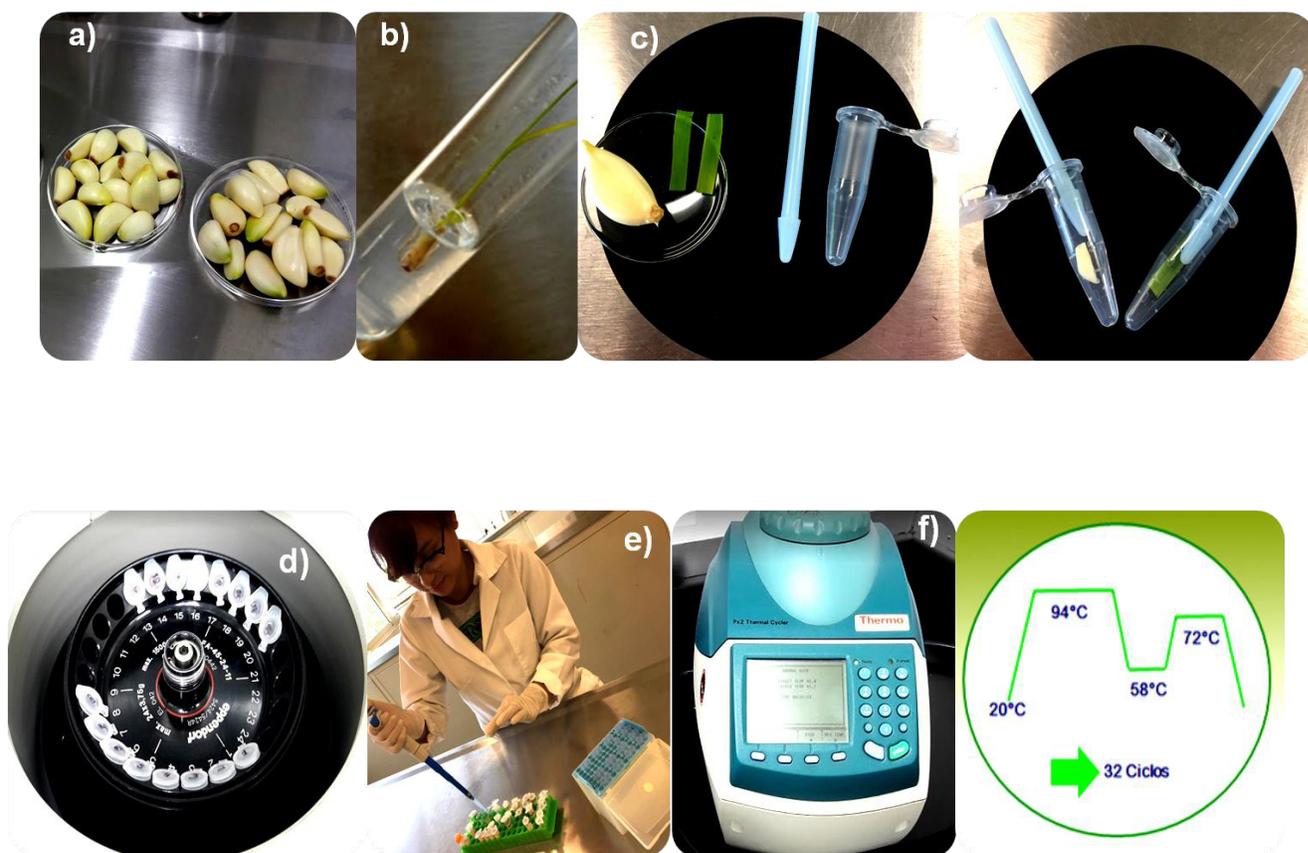
### 3.8. Análisis Molecular por RT-PCR

Se corroboró el diagnóstico de la prueba serológica ELISA mediante el análisis molecular RT-PCR. Se seleccionaron dos muestras la primera se integró por 5 bulbillos y la segunda muestra fue de hojas obtenidas de plántulas regeneradas *in vitro* a partir de ápices y domos meristemáticos de aproximadamente 30 d de los cultivares DF y Tig para posteriormente iniciar con la extracción del ácido ribonucleico (RNA) a partir de 50 mg de fragmentos de tejido vegetal utilizando el método de Trizol (MRC).

La síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADN<sub>c</sub>) se realizó una vez obtenido el ARN total. El ARN fue incubado a 65 °C por 5 min en el termociclador y las muestras se dejaron en hielo por 2 min. Se añadió una mezcla compuesta de 2 µl de solución buffer M-MLV 5X, 1.3 µl de desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTP's) 2.5 mM, 0.125 µl de RNAsin 40 U/µl, 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV 200 U µl<sup>-1</sup>, 0.5 µl del oligonucleótido OYDV R-10539 10 µM y finalmente se complemento con agua grado mili-Q. Las reacciones fueron incubadas a 42 °C por 1 h y a 94 °C por 2 min para inactivar la enzima.

Al obtener el ADN<sub>c</sub> se realizó una amplificación de los ácidos nucleicos mediante el PCR. Iniciando con una mezcla de reacción con los siguientes componentes: 5 µl de amortiguador de reacción PCR 5X, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de dNTP's 2.5 mM, 2 µl de los oligonucleótidos de OYDV-R (5'ACG TTA CCA TCC AGG CCA AA-3') y OYDV-F (5'-AGT GAT GCA GCT GAA GCA TAC ATT-3') 10 µM, 2 µl de Go-Taq ADN polimerasa 5 U µL<sup>-1</sup> 3 µl de ADN<sub>c</sub> y se añadió 9.3 µL de agua grado Mili-Q para completar un volumen final de 25 µL (Majumder y Baranwal., 2014). Las reacciones

de PCR se colocaron en el termociclador para la fase inicial de desnaturalización con un ciclo de 94 °C por 5 min seguido por temperaturas de 94-58-72 °C durante 45-20-60 s por 32 ciclos de amplificación y finalmente se dio la extensión a 72 °C por 5 min. Una vez obtenida la amplificación por PCR se utilizó el método de electroforesis en geles de agarosa al 1 % para separar los fragmentos de ADN en función de su tamaño y visualizarlos mediante una tinción de 0.02  $\mu\text{L}$  en una solución con bromuro de etidio ( $10 \text{ mg/mL}^{-1}$ ), corridos por 50 min a 100 v. Finalmente los geles se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomaron fotografías (Figura 8).



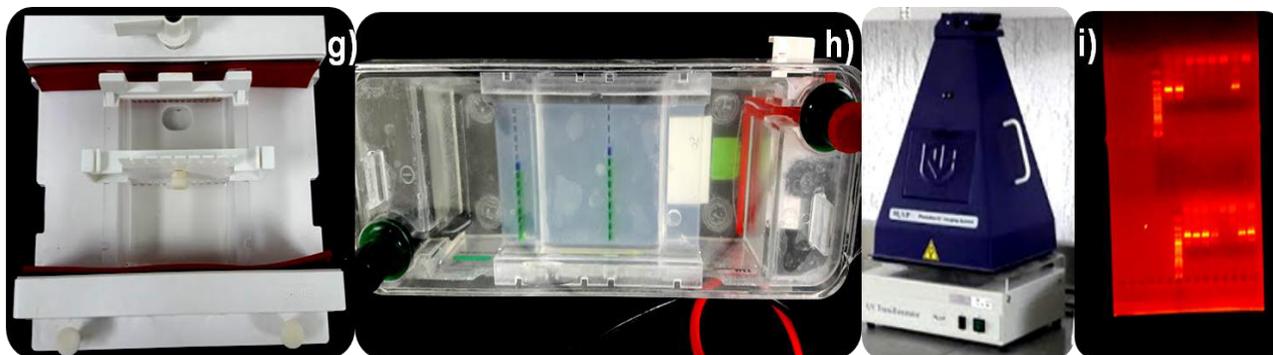


Figura 8. Proceso del análisis molecular RT-PCR. a) Muestra compuesta de bulbos, b) Segunda muestra integrada por hojas de plántulas regeneradas *in vitro*, c) Maceración del tejido vegetal a partir de 50 mg, d) Extracción del ARN por el método trizol, e) Síntesis de ADN<sub>c</sub>, f) Amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR g) Preparación del gel de agarosa al 1 %, h) Electroforesis corrido por 40 min a 100 v, i) Visualización de los geles mediante una tinción con bromuro de etidio observados en un transiluminador de luz ultravioleta.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Diagnóstico Serológico ELISA

La muestra compuesta por 5 bulbos de ajo del cultivar DF analizada por la técnica serológica ELISA dio como resultado positivo al potyvirus del enanismo amarillo de la cebolla (Cuadro 8). Significando que al menos uno de los bulbillos de la muestra contiene el OYDV

Cuadro 7. Resultado de la prueba serológica Elisa de seis virus.

Virus	Género	ELISA
Virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV)	Potyvirus	+
Virus Rayado amarillo del puerro (LYSV)	Potyvirus	-
Virus Moteado amarillo del iris (IYSV)	Tospovirus	-
Virus Mosaico del pepino (CMV)	Cucumovirus	-
Virus Latente del chalote (SLV)	Carlavirus	-
Virus Latente común del ajo (GarCLV)	Carlavirus	-

†+Resultado positivo

‡-Resultado negativo

### 4.2. Diagnóstico del Análisis Molecular por RT-PCR

El resultado obtenido por el análisis serológico ELISA fue corroborado por un análisis molecular por RT-PCR de muestras compuestas por bulbos de ajo de los cultivares DF y Tig. La amplificación obtenida del PCR permitió visualizar en el transiluminador de luz ultravioleta amplificaciones de bandas de aproximadamente 318 pares de bases siendo el tamaño esperado en muestras positivas al OYDV (Figura 9). El

resultado obtenido por RT-PCR coincidió con el resultado de la prueba serológica ELISA dando positivo al OYDV.

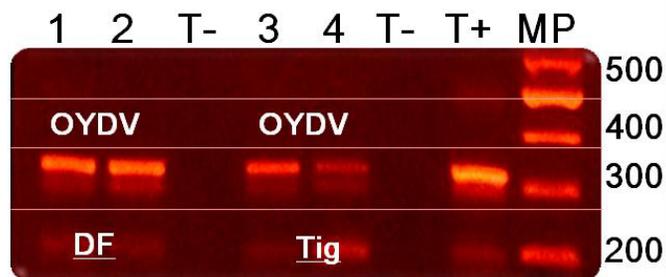


Figura 9. Electroforesis en un gel de agarosa al 1 % de los productos obtenidos de la amplificación por PCR del virus OYDV a partir de ARN de bulbos de ajo de los cultivares DF y Tig del municipio de Aramberri N.L.

#### 4.3. Secuenciación y Comparación de ADN de Bulbos de Ajo

Los fragmentos amplificados de las muestras fueron secuenciadas, analizadas y finalmente comparadas con el banco de genes (GenBank) mediante el programa BLAST. El nivel de identidad de los nucleótidos de la secuencia comparada en el GenBank fue de un 98 % al virus OYDV (Figura 10).

Sequences producing significant alignments:						
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected 0						
<a href="#">Alignments</a> <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Onion yellow dwarf virus partial gene for polyprotein, isolate sd_jinxiang, genomic RNA</a>	360	360	35%	3e-95	98%	<a href="#">gi 18564915 AJ409311.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Onion yellow dwarf virus isolate MS/SW1, complete genome</a>	282	282	37%	6e-72	88%	<a href="#">gi 330370504 HC258894.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Onion yellow dwarf virus isolate SG1, complete genome</a>	280	280	34%	2e-71	90%	<a href="#">gi 452817823 JX429964.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Onion yellow dwarf virus isolate Rajasthan nonfunctional polyprotein gene, partial sequence</a>	268	268	34%	1e-67	90%	<a href="#">gi 156491439 EU045556.1</a>

Figura 10. Resultado de la secuenciación comparada con el banco de genes GenBank con un 98 % de identidad al OYDV.

#### 4.4. Análisis por RT-PCR de Plántulas *in vitro*

El resultado del análisis por RT-PCR de plántulas regeneradas *in vitro* de dos tipos de explantes (ápices y domos meristemáticos) del cultivar DF mostraron en el gel de

agarosa bandas de aproximadamente 318 pares de bases (pb) que corresponden al potyvirus OYDV (Figura 11), siendo un resultado similar al que reportaron Ghaemizaden *et al.*, (2014).

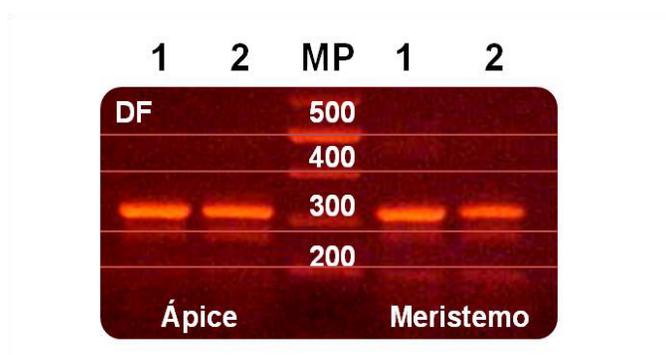


Figura 11. Resultado de dos tipos de explantes en el gel de agarosa al 1 % tuvieron amplificaciones de bandas de 318 pb correspondientes al OYDV.

Es preciso mencionar que los ápices caulinares tenían un tamaño de 10 mm y los domos meristemáticos 3 mm ambos tipos de explantes no fueron sometido a tratamientos térmicos.

#### **4.5. Análisis por RT-PCR en Explantes Expuestos a Termoterapia y Regenerados *in vitro***

Los resultados del primer establecimiento *in vitro* dieron positivos al OYDV por lo tanto en el segundo establecimiento se decidió hacer uso de la termoterapia con diferentes tratamientos térmicos y combinarlo con el cultivo de tejidos vegetales con la finalidad de erradicar el potyvirus de las plántulas.

Los 16 tratamientos se integraron por dos cultivares (DF y Tig) el resultado en algunas de las muestras permitió visualizar fragmentos amplificados por PCR de aproximadamente 318 pb correspondientes al OYDV, sin embargo algunas de las

muestras no presentaron amplificación de fragmentos lo que significó ausencia del potyvirus.

Las plántulas *in vitro* del cultivar DF regeneradas a partir de ápices caulinares de un tamaño promedio de 5-8 mm fueron analizadas detectándose la presencia del OYDV en los T1, T2 y T4. La respuesta se atribuye al tamaño de los explantes lo que nos demuestra que la porción del tejido tienen una gran influencia en el saneamiento del material vegetal, es decir si el explante es más pequeño se puede llegar a obtener plantas libre de virus (Faccioli y Marani, 1998; Pérez, 1998).

En el T3 los bulbillos fueron expuestos a 40 °C por 40 d y no se produjo ningún producto de amplificación, es decir las plántulas *in vitro* correspondientes al T3 no estaban infectadas del OYDV (Figura 12). Es importante mencionar que la técnica de cultivo de tejidos en combinación con la termoterapia en ápices caulinares (5-8 mm) de un tamaño relativamente grande resultó ser eficiente en la eliminación del OYDV. Existen estudios que han demostrado que temperaturas altas benefician la degradación del ARN viral en los ápices de los brotes de algunas especies en crecimiento activo (Wang *et al.*, 2008).

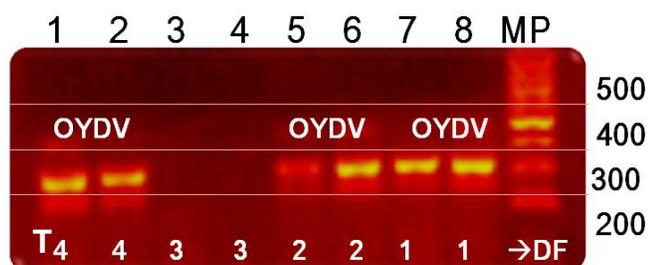


Figura 12. Amplificaciones por RT-PCR del ADNc del OYDV en muestras obtenidas de hojas de plántulas *in vitro* regeneradas a partir de ápices caulinares del cultivar DF. En la parte inferior se observa el número de los tratamientos.

Las plantúlas *in vitro* regeneradas a partir de domos meristemáticos de un tamaño de 1 a 2 mm mostraron amplificaciones por PCR en dos muestras del T5 y una muestra del T8, los resultados se deben a que en el T5 los explantes no se sometieron a ningún tratamiento térmico lo que nos indica que debe ser necesario para erradicar el virus en explantes de este tamaño. En el T8 los explantes se sometieron a calor húmedo a 50 °C por una hora siendo no suficiente para eliminar el virus

En la figura 13 podemos observar la ausencia del virus en los T6 y T7 donde los explantes fueron expuestos a calor seco a 40°C en un lapso de 20 y 40 d teniendo un efecto positivo al no amplificar la región específica del OYDV. La respuesta que se obtuvo en los tratamientos térmicos se debe principalmente a la termoterapia que resultó ser una técnica eficaz en la eliminación del potyvirus. Wang *et al.*, (2008) reportaron que existe una relación entre la temperatura y el silenciamiento de ARN que actúa como un medio para aumentar la degradación de ARN viral. La eficiencia podría mejorarse a medida que se prolongan los períodos de tiempo en la termoterapia, sin embargo no debemos olvidar que si se extienden los periodos de tiempo o se aumenta la temperatura pueden ser factores negativos que influyan en el desarrollo *in vitro* de la plantúla.



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % donde hubo amplificación de producto por PCR del OYDV haciéndose presente en muestras de cultivo *in vitro* de meristemas del cultivar DF en los T5 Y T8.

Los resultados presentados en los ocho tratamientos del cultivar DF nos permite mostrar que la termoterapia en combinación con el cultivo de tejidos tiene una respuesta positiva al usar como fuente de explante domos meristemáticas de un tamaño aproximado de 1 a 2 mm debido a que se logró obtener material vegetal libre del OYDV (Cuadro 7). En el cultivar Tig donde la fuente de explantes que se utilizó fueron ápices caulinares el resultado presento la ausencia del virus en los T10, T11 y T12 los cuáles recibieron calor seco y otros húmedo. En la figura 14 podemos observar que en estos tratamientos no se presentó ninguna banda amplificada a excepción del T9 dónde los ápices no tuvieron ningún tratamiento térmico.

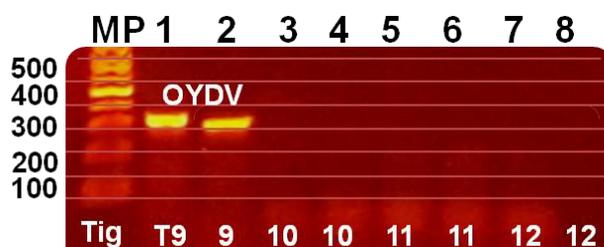


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % correspondiendo al OYDV del T9 cultivar Tig. En el T10, T11 y T12 no se produjo ninguna banda amplificada de ADN<sub>c</sub> del OYDV.

El resultado de los tratamientos del 13 al 16 corresponden a plantúlas *in vitro* regeneradas a partir de domos meristemáticas y se observa en la figura 15 la amplificación de la banda obtenida por PCR correspondiente a nuestro testigo positivo del OYDV, sin embargo en los carriles del 1-8 (T13, 14, 15 y 16) no se observa ninguna amplificación por PCR significando que existe ausencia del virus en los cuatro tratamientos del cultivar Tig (Cuadro 9). Esto significa un resultado favorable indicando que en el cultivar Tig el hacer uso solamente de la técnica de cultivo de domos meristemáticos es efectiva. La respuesta se debe a que los virus se

propagan en todos los órganos de la planta mediante las células a través de los plasmodesmo y al movimiento vertical que ocurre en los tejidos vasculares (Leisner y Howell, 1993; Lucas y Gilbertson, 1994). Sin embargo los meristemas son células indiferenciadas capaces de tener división celular continúa sin estructuras internas significando que los sistemas de plasmodesmos y el sistema vascular no se han diferenciado aún y el virus que se encuentran en las células infectadas no puede invadir el tejido meristemático (Ayabe y Sumi, 2001).



Figura 15. Detección molecular por RT-PCR del OYDV de muestras de plántulas del cultivar Tig obtenidas a partir de meristemas en conjunto con termoterapia. T+=control positivo.

Cuadro 8. Diagnóstico molecular por RT-PCR de plántulas regeneradas *in vitro*.

T	Cultivar	Explante	Termoterapia		OYDV	% de plantúlas libres de OYDV
			C°	d/h		
T1	DF	Á	-----	-----	+	0
T2	DF	A	40	20 d	+	0
T3	DF	A	40	40 d	-	100
T4	DF	A	50	1 h	+	0
T5	DF	M	-----	-----	+	0
T6	DF	M	40	20 d	-	100
T7	DF	M	40	40 d	-	100
T8	DF	M	50	1 h	+	50
T9	Tig	Á	-----	-----	+	0
T10	Tig	A	40	20 d	-	0
T11	Tig	A	40	40 d	-	100
T12	Tig	A	50	1 h	-	100
T13	Tig	M	-----	-----	-	100
T14	Tig	M	40	20 d	-	100
T15	Tig	M	40	40 d	-	100
T16	Tig	M	50	1 h	-	100

†A= Ápice

‡M=Meristemo

#### 4.6. Establecimiento *in vitro* de Ápices Caulinares y Domos Meristemáticas

En el establecimiento *in vitro* los procesos de predesinfección y desinfección a los que se sometió el material vegetal infestado permitió la eliminación total de microorganismos superficiales. A los siete días posteriores al establecimiento se realizó un monitoreo donde los explantes alcanzaron el 100 % de asepsia, sin daños de oxidación y su estado era viable para continuar con las siguientes etapas (Figura 16). Este resultado se atribuye al contenido de sulfatos como la alicina que contiene los bulbillos de ajo proporcionando un amplio espectro antimicrobiano y antifúngico (Ledezma y Aptiz, 1998; Ghannoum *et al.*, 2004).

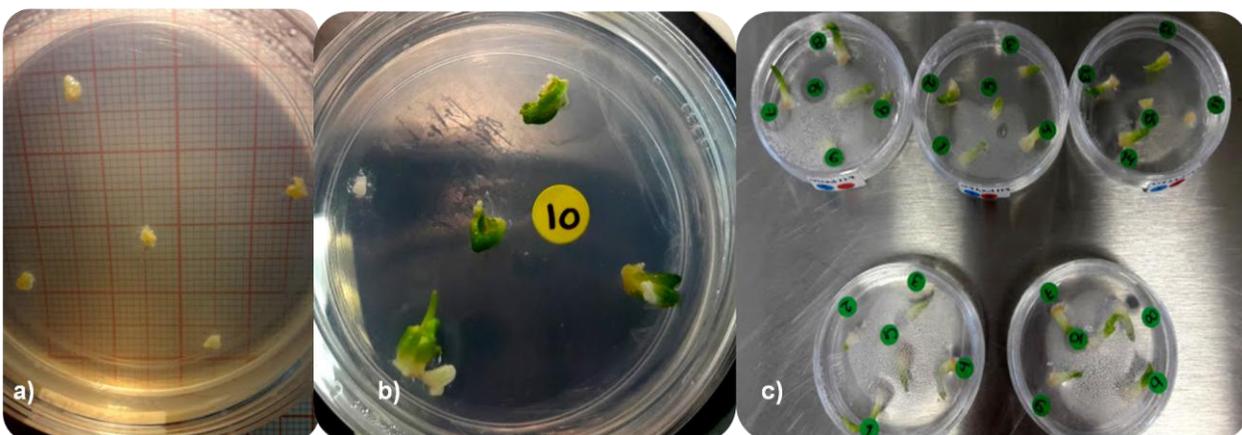


Figura 16. Explantes de *Allium sativum* L. inoculados en medio de cultivo MS. a) Domos meristemáticas en el del establecimiento aséptico de tamaño aproximado de 2 mm, b) Domos meristemáticas con 100 % de asepsia a los 7 d del establecimiento, c) Ápices caulinares a los 7 d posteriores al establecimiento aséptico.

#### 4.7. Inducción de Brotes del Cultivar DF Inoculados en Medio Nutritivo MS y LS

Transcurridos los 14 días del subcultivo en medio nutritivo MS y LS suplementado con BAP se observó el desarrollo de los explantes. El análisis estadístico de la variable longitud mostró diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre los tratamientos permitiendo realizar una comparación de medias por Tukey (Figura 17).

Las plántulas *in vitro* del testigo que corresponden al medio de cultivo MS enriquecido solamente con vitaminas tuvieron el mayor crecimiento longitudinal dónde la media fue de 2.56 cm seguido por el T2 dónde se usaron las sales básicas del medio LS suplementado con BAP y los explantes alcanzaron una altura de 2.28 cm. Finalmente los que tuvieron un menor crecimiento fue el T1 con una media de 1.53 cm de largo (Figura 18). Carhuarica *et al.*, (2012) menciona que 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 y en este caso se corrobora con el testigo.

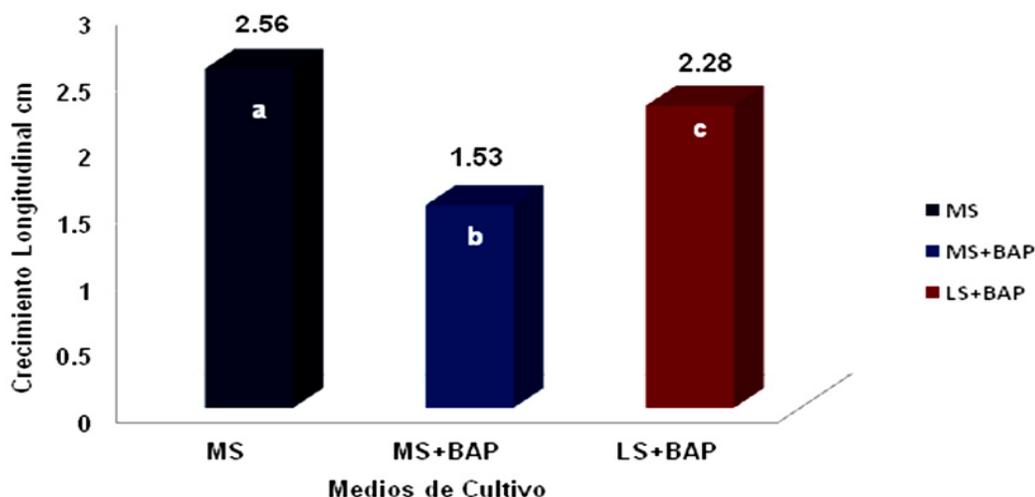


Figura 17. Prueba de medias por Tukey en tres tratamientos (MS, MS+BAP y LS+BAP) la variable a medir fue el crecimiento longitudinal de las plántulas *in vitro*.

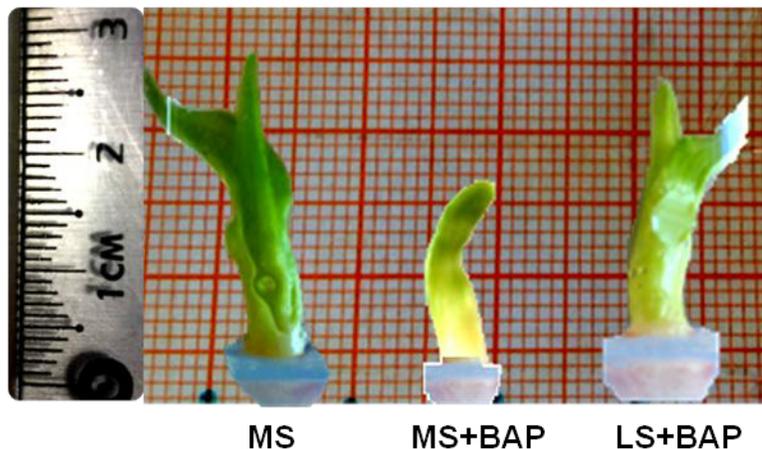


Figura 18. Plántulas regeneradas *in vitro* del cultivar DF a 14 d del subcultivo en tres medios nutritivos enriquecido con vitaminas y BAP.

#### 4.8. Efecto de la Termoterapia en el Establecimiento *in vitro*

Transcurridos 14 d posteriores al establecimiento aséptico se evaluó el porcentaje de supervivencia de los explantes y se observó que el material vegetal que no fue expuesto a tratamientos térmicos de ambos cultivares tuvieron una tasa de supervivencia del 100 % a diferencia de los explantes que fueron sometidos en calor seco a temperaturas de 40 °C por 20 d alcanzó un 75 % y a los 40 d un 65 % de supervivencia (Figura 19). El tipo de explante también influyó en el crecimiento óptimo del material vegetal los primeros cuatro tratamientos pertenecen a los ápices como fuente de explante alcanzando una media del 71 % de supervivencia y en domos meristemáticas un 81 %, esta respuesta se puede atribuir al ápice que fue extraído de un tamaño mayor al meristemo por lo tanto el tejido vegetal estuvo más expuesto al calor seco contrario de los meristemas el tejido de los primordios foliares ayudaron dando protección y conservar las células meristemáticas. El calor húmedo al contrario del calor seco estimulo el crecimiento de los explantes alcanzando el 90 % de material viable en ápices y domos meristemáticos.

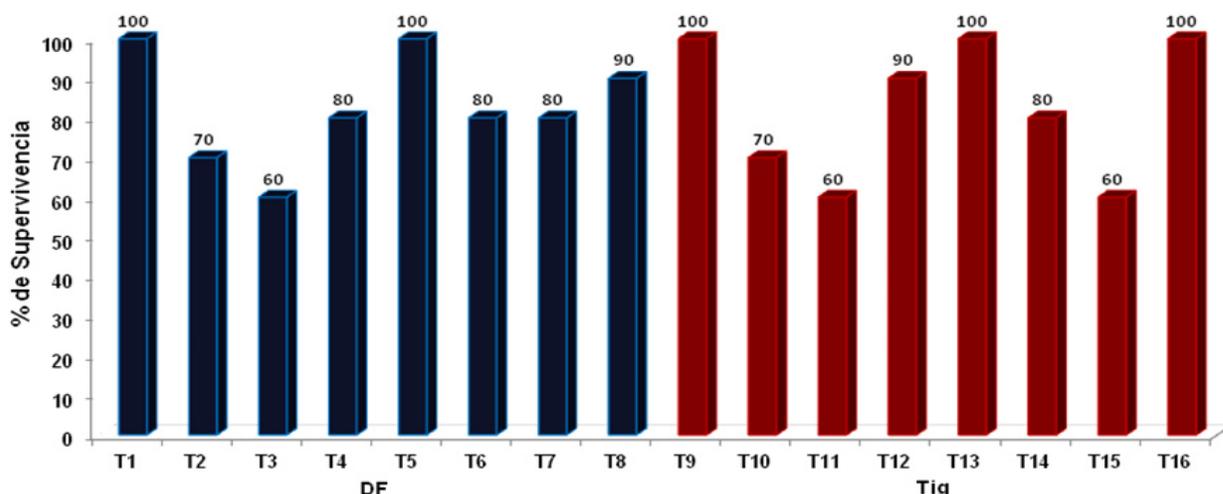


Figura 19. Efecto de la termoterapia a los 14 d del establecimiento aséptico en dos tipos de explante:ápices y domos meristemáticos de los cultivares DF y Tig alcanzando el 100 % de supervivencia el material vegetal que no recibió tratamientos térmicos.

#### 4.9. Evaluación del Crecimiento de Explantes Expuestos a Termoterapia

Los ápices y domos meristemáticos fueron evaluados a 21 d del establecimiento *in vitro* mostrando una diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) en los tratamientos de termoterapia dónde la temperatura y el tipo de explantes influyeron en el crecimiento longitudinal (Cuadro 10).

Los domos meristemáticos inoculados en el medio de cultivo MS mostraron mayor crecimiento alcanzando una media de 2.275 cm a diferencia de los ápices caulinares (Figura 20).

Cuadro 9. Comparación de medias del crecimiento longitudinal de los explantes.

Condición	DF		Tig	
	Ápice	Domo Meristemático	Ápice	Domo Meristemo
Control	1.91 b	1.86 b	4.01 a	1.81b
40°C-20 d	1.35 c	0.81 c	1.97 b	1.3 c
40°C-40 d	1.14 c	1.23 b	1.35 c	0.6 c
50°C-1 h	2.82 a	2.79 a	1.1 c	2.02 a

†Medias con la misma letra en cada columna no muestran diferencia significativa, Tukey sig.  $p \leq 0.05$ .

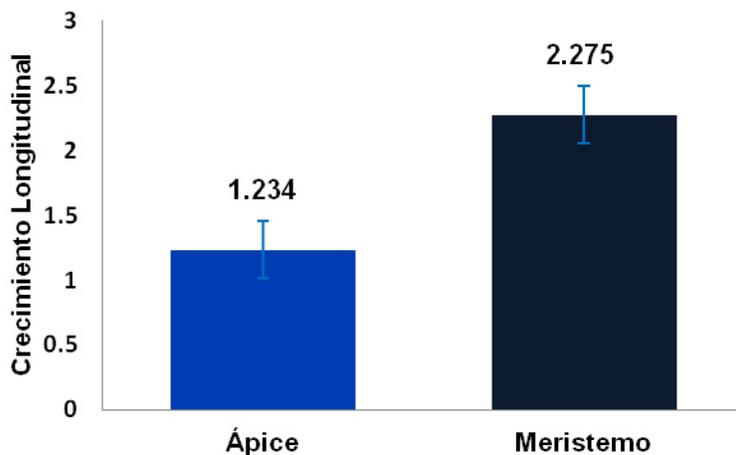


Figura 20. Crecimiento longitudinal a los 21 d del establecimiento *in vitro*.

Las interacciones donde se evaluó el tipo de explante y temperatura mostraron diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). Los explantes del cultivar DF expuestos a calor húmedo con una temperatura de 50 °C por una hora mostraron mayor crecimiento longitudinal con una media de 2.374 cm seguido por los explantes que no tuvieron ningún tratamiento térmico, en cambio los bulbillos que fueron sometidos a 40 °C por 20 y 40 d tuvieron un crecimiento menor con una media de 1.329 cm. El calor seco reduce evidentemente el crecimiento de los explantes a diferencia del calor húmedo que aumento su crecimiento esta respuesta se atribuye que los bulbillos al ser sometidos al calor humedo (50 °C por 1 h) estimulo la desdiferenciación celular y por consiguiente tuvieron un mayor desarrollo de las plantúlas *in vitro* el resultado se puede corroborar por lo mencionado por Varés *et al.*, 2009.

En el cultivar Tig los bulbillos que no recibieron ningún tratamiento térmico tuvieron mejor respuesta con un crecimiento de 2.677 cm a diferencia del cultivar DF que le favoreció las condiciones de calor húmedo (Figura 21).

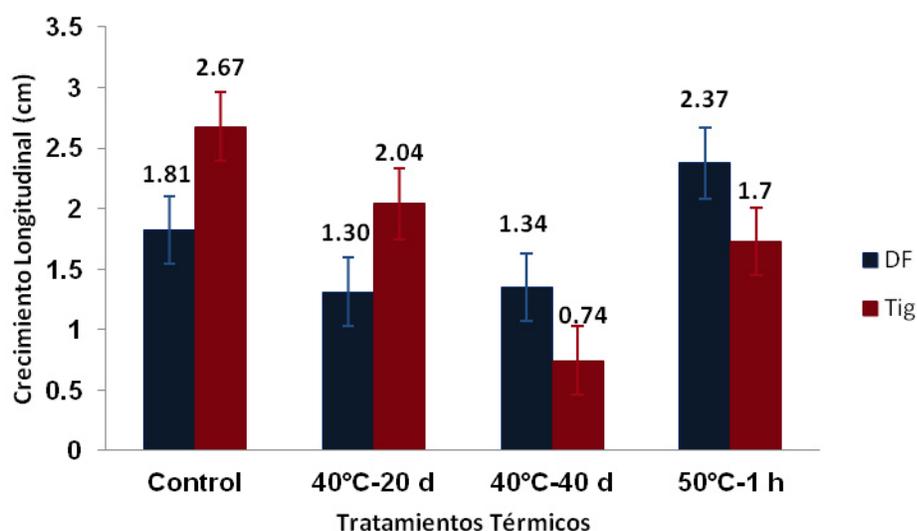


Figura 21. Efecto de la interacción de dos cultivares (DFy Tig) analizadas a 21 d de su establecimiento *in vitro* donde los explantes tuvieron cuatro condiciones de termoterapia evaluándose el crecimiento longitudinal.

De las interacciones evaluadas las condiciones térmicas y tipo de explante en ambos cultivares (DF y Tig) produjo mejor respuesta en la variable del crecimiento longitudinal los domos meristemáticos que alcanzaron una media de 2.362 cm cuando no recibieron ningún tipo de tratamiento térmico y los explantes que fueron expuestos a calor húmedo alcanzaron una media de 2.191 cm en longitud (Figura 22).

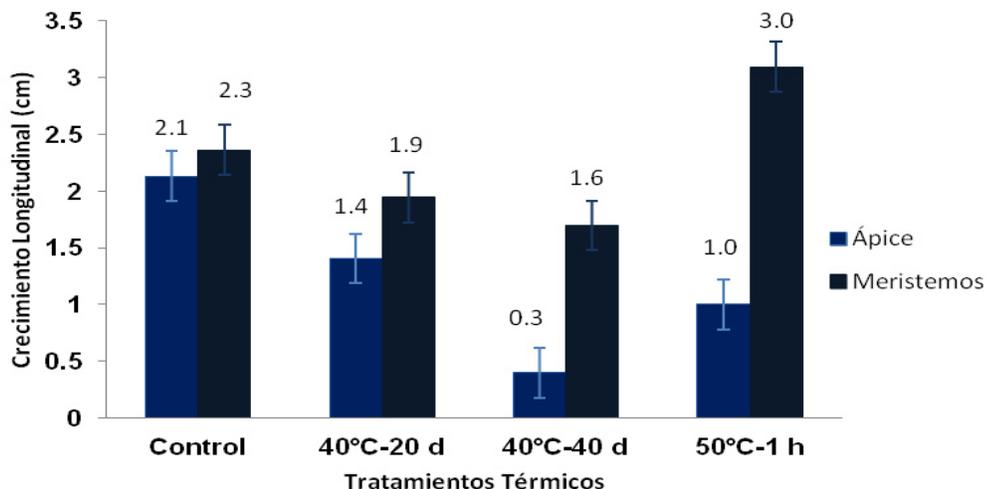


Figura 22. Efecto de la interacción tipo de explante y condiciones térmicas que fueron sometidos los bulbillos previo al establecimiento aséptico.

#### 4.10. Etapa de Inducción y Proliferación de Brotes *in vitro*

En la etapa de inducción de brotes de cuerdo a la comparación de medias el T2 presentó el 100 % de inducción con una media de 3.4 brotes por plántula seguido por el T16 con el 86 % de inducción logrando 2.6 brotes por explante (Cuadro 11)

El análisis de varianza presentó diferencia no significativa en los factores de citocininas y tiempo. El resultado obtenido puede compararse con lo reportado por Carhuaricra *et al.*,(2012) mencionando que el periodo de formación de brotes no tiene un efecto diferencial entre las citocininas y el tiempo por lo tanto no existe alguna relación sobre esta variable.

El análisis de varianza mostró diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el factor cultivar. Los tratamientos nos muestran una mayor respuesta en el cultivar Tig con una media de 3.17 brotes adventicios por plántula (Figura 23).

La diferencia puede atribuirse al efecto del genotipo indicandonos que el cultivar tiene cierto grado de influencia en la respuesta de proliferación de brotes (Figura 24). El resultado se corrobora con lo mencionado por Quintana *et al.*,(2005) donde determinan que existen factores genéticos que están involucrados en la respuesta a dichas variables, por lo que recomiendan hacer un estudio de la caracterización y ubicación en el genoma y de esta forma se podría tener un antecedente de los genotipos que se usarían y la posible respuesta del material al regenerarse *in vitro*.

Cuadro 10. Porcentaje de inducción y número de brotes a 20 y 40 d en DF y Tig.

Tratamiento	Cultivar	% Brotes	N° Brotes	% Brotes	N° Brotes
		20 d	20 d	40 d	40 d
T1	Tig	86	2.7	86	3.0
T2	Tig	100	2.9	100	3.4
T3	Tig	43	1.0	43	1.6
T4	Tig	14	0.4	43	0.7
T5	Tig	57	1.9	71	2.3
T6	Tig	43	1.7	43	2.4
T7	Tig	71	1.4	71	2.3
T8	Tig	57	1.4	57	1.6
T9	DF	29	0.4	29	0.6
T10	DF	43	0.6	43	0.7
T11	DF	71	1.7	86	2.7
T12	DF	43	0.7	43	1.0
T13	DF	14	0.3	14	0.3
T14	DF	71	1.9	86	2.4
T15	DF	57	1.9	71	2.3
T16	DF	86	2.0	100	2.6

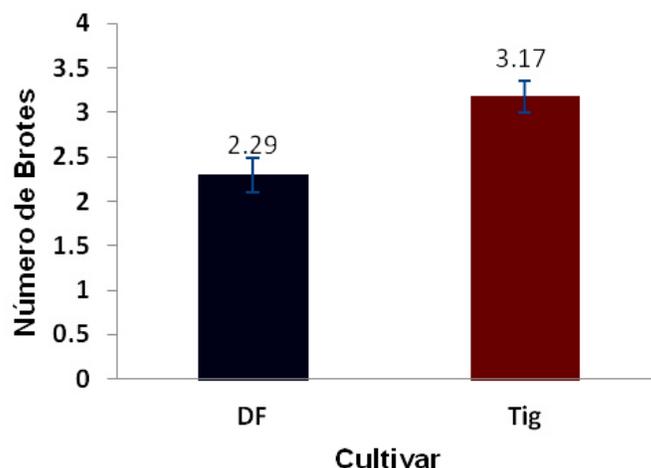


Figura 23. Número de brotes por explante de los cultivares DF y Tig a 40 d del subcultivo en medios con citocininas.

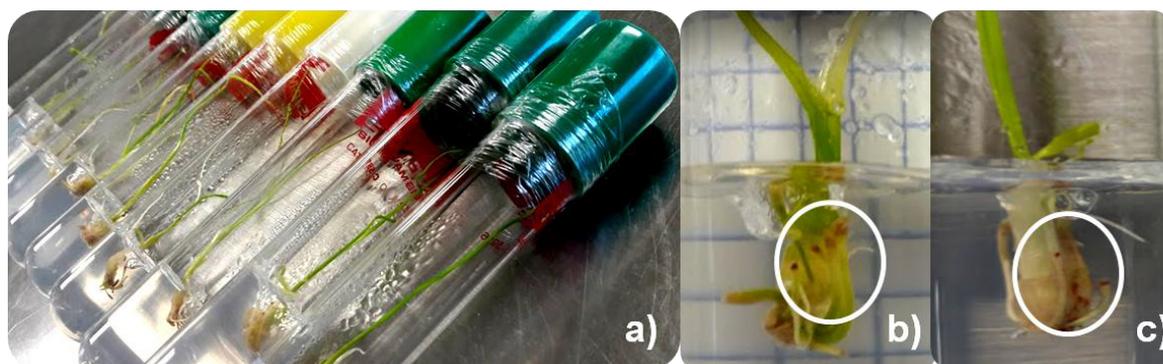


Figura 24. Plántulas regeneradas *in vitro* de dos cultivares DF y Tig. a) Brotes adventicios del cultivar DF a 40 d, b) Brotes adventicios regenerados *in vitro* en el cultivar Tig a 40 d del subcultivo.

En las interacciones de los factores cultivar y citocinina (2-iP) evidenciaron diferencias altamente significativas dónde pudimos constatar que el cultivar Tig mostró una media de 3.4 brotes por plántula cuando hubo ausencia del 2-iP. Lo contrario del cultivar DF el cuál incremento la tasa de número de brotes al enriquecer el medio nutritivo con la citocinina (2-iP) a una dosis de  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  (Figura 25). Esto coincide con lo reportado por Olivera (2009) y Carhuaricra *et al.*, (2012) indicándonos que en la etapa de proliferación obtuvieron mejores resultados al utilizar el regulador

de crecimiento 2-iP y en ciertos cultivares logró una mayor respuesta de macollamiento (Figura 26).

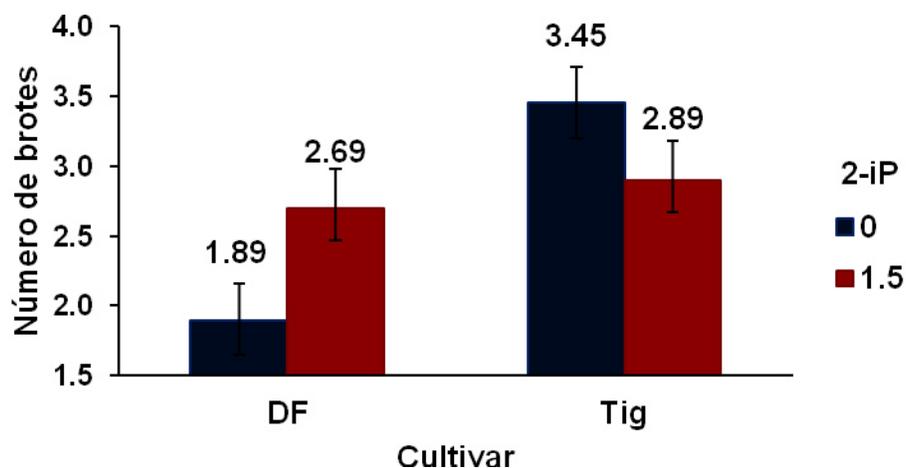


Figura 25. Efecto de la interacción de los factores de dos cultivares (DF y Tig) y la citocinina 2-iP (0.0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>) en el número de brotes adventicios diferenciados.

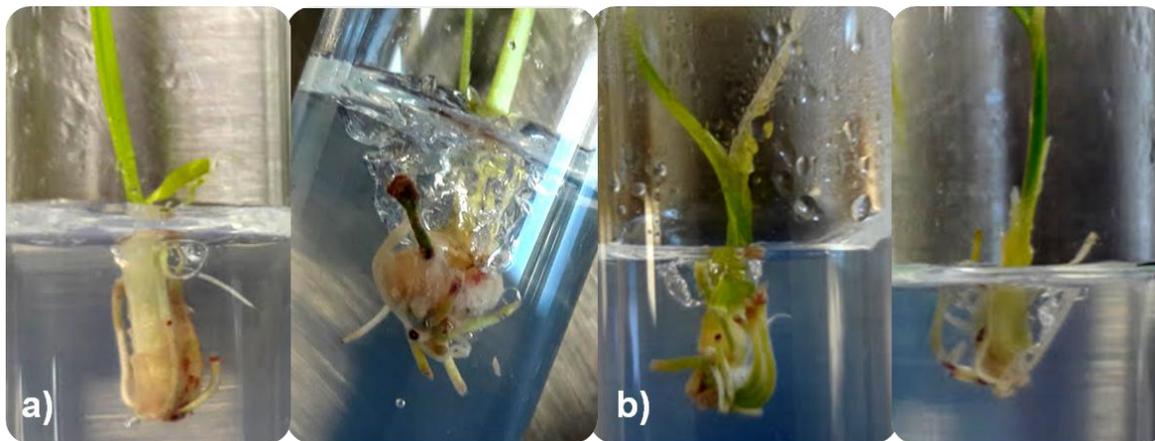


Figura 26. Brotes adventicios desdiferenciados en medios suplementados con 2-iP, a) Cultivar Tig produjo una tasa de 2.69 brotes por explante, b) Cultivar DF una tasa de 3.45 brotes por plántula.

En los factores cultivar y citocinina (BAP) el análisis de varianza nos indicó que hubo diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). En las cuáles se alcanzaron medias de 2.62 en el cultivar Tig y 2.69 brotes en DF teniendo valores similares cuando se le añadió al medio 1.5 mgL<sup>-1</sup> de BAP. Sin embargo el contraste que se obtiene es que

el medio que no se le adiciono BAP el cultivar Tig se incremento con una media de 3.76 brotes por explante es interesante poder comparar dos cultivares donde el efecto del BAP en dosis iguales no arroja un resultado similar (Figura 27).

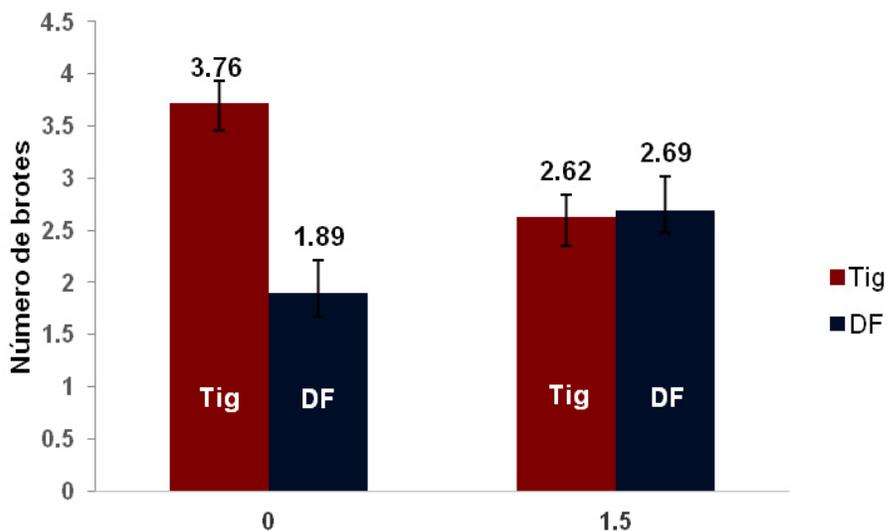


Figura 27. Efecto de las interacciones cultivar (Tig y DF) y BAP (0 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>).

En las interacciones del factor citocininas 2-iP y BAP mostró diferencia altamente significativa ( $p \leq 0.05$ ). Fue evidente que al combinar las citocininas a una dosis de 1.5 mgL<sup>-1</sup> el resultado no inhibió la inducción de brotes pero sí disminuyó el número de propágulos. El mejor resultado se obtuvo cuando solamente se usó una citocinina a concentración de 1.5 mgL<sup>-1</sup> en el medio. BAP obtuvo una media de 3.0 brotes muy similar al 2-iP con 2.9 propágulos (Figura 28). Gull *et al.* (2014) mencionan que el BAP es un potente regulador de crecimiento para la inducción de brotes en el cultivo de ajo, sin embargo al combinar el BAP con otra citocinina no es favorable dando como resultado un número reducido de brotes.

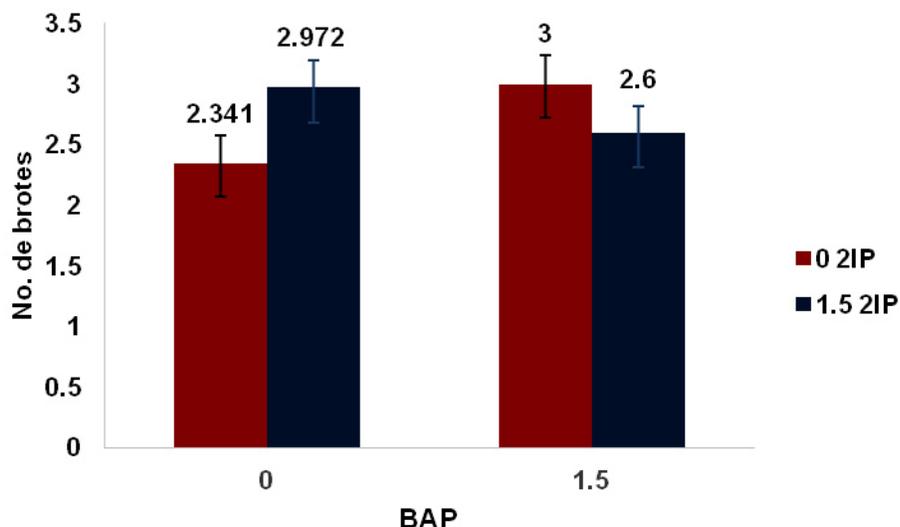


Figura 28. Interacción de los factores 2-iP y BAP (0 y 1.5 mg<sup>-1</sup>).

El efecto de la interacción de tres factores cultivar y dos citocininas (2-iP y Kin) mostró diferencia altamente significativa corroborándose una vez más que de los dos cultivares que se analizaron bajo las mismas condiciones Tig demuestra tener un efecto positivo cuando se añade al medio nutritivo Kin en concentraciones de 1.5 mgL<sup>-1</sup> alcanzando una media de 4.12 brotes a diferencia del 2-iP que sólo desdiferencio 3.26 brotes adventicios por plantúla. Con los resultados obtenidos se corroboro que al combinar las dos citocininas a concentraciones de 1.5 mgL<sup>-1</sup> inhibio el crecimiento en el cultivar Tig obteniendo 2.52 brotes a diferencia del cultivar DF que logró obtener el mayor número con una media de 2.9 brotes (Figura 29). Sharma (2012) declara que la Kin es el potenciador de brotes más apropiado en el cultivo de ajo. Esta respuesta es similar a lo reportado por Gull *et al.* (2014), donde mostraron que la Kin es una fitohormona ideal para la formación de brotes de ajo ya que en su estudio se observó que al aumentar la concentración de Kin a 1.5 mgL<sup>-1</sup> en el medio existe un aumento significativo, sin embargo al incrementar la dosis de Kin a un

rango mayor de  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  o al combinarla con otra citocinina en dosis similares disminuye el crecimiento longitudinal y el número de brotes se reduce. Este resultado se compara al que se observó en el cultivar Tig que disminuyó el número de propágulos a 2.52 cuando al medio fue enriquecido con dos fitohormonas (2-iP y Kin) a concentraciones de  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$ .

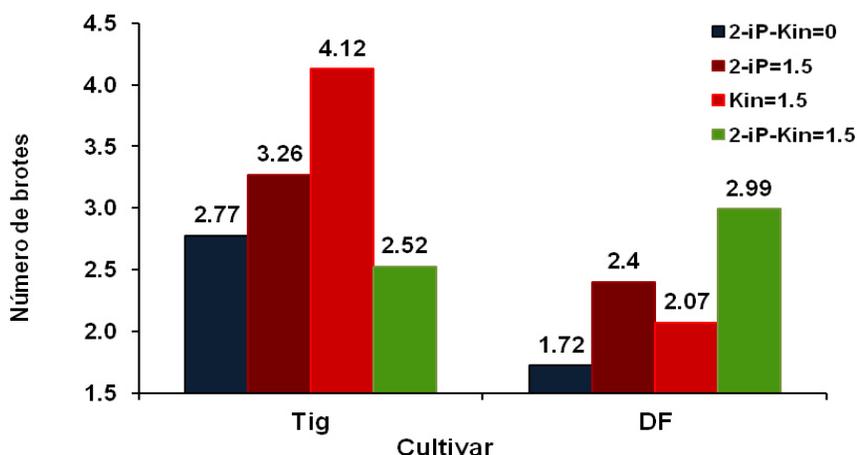


Figura 29. Resultado de la interacción de los cultivares (Tig y DF) y las hormonas de crecimiento (2-iP y Kin).

#### 4.11. Crecimiento Longitudinal de Plántulas *in vitro*

La variable crecimiento longitudinal de las plántulas *in vitro* presentó diferencia no significativa entre los 16 tratamientos donde se evaluaron tres citocininas en dos concentraciones, sin embargo el tiempo si es un factor que influye en el crecimiento longitudinal pudimos observar en este estudio que entre más días los explantes permanecieron en los medios nutritivos favoreció el crecimiento longitudinal es decir a los 20 d alcanza una altura promedio de 6.97 cm el cultivar Tig y 6.48 cm el cultivar DF y posteriormente a los 40 d los explantes alcanzaron una media de 9.4 cm y en DF 8.8 cm de largo ambos cultivares su resultado fue muy similar (Figura 30 y 31).

La altura de las plántulas regeneradas *in vitro* se atribuye principalmente al efecto que realizan los macronutrientes y micronutrientes en este caso en específico hablamos de las sales que integran el medio nutritivo MS. Es importante mencionar que el crecimiento longitudinal no se debe en sí a las fitohormonas. El resultado de este estudio se compara con lo mencionado por Carhuaricra *et al.* (2012) donde coincidimos con ellos al corroborar que los microelementos resultan ser indispensables para el crecimiento.

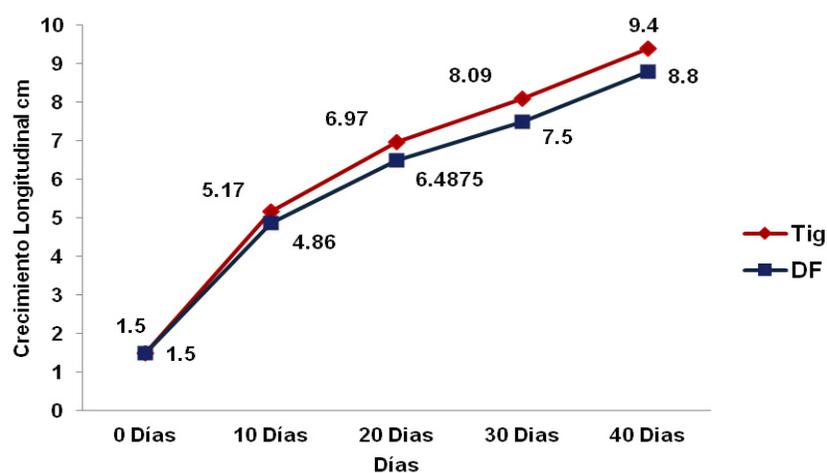


Figura 30. Crecimiento longitudinal de las plántulas *in vitro* con un tamaño inicial de 1.5 cm evaluados a 10, 20, 30 y 40 d de los cultivares Tig y DF.

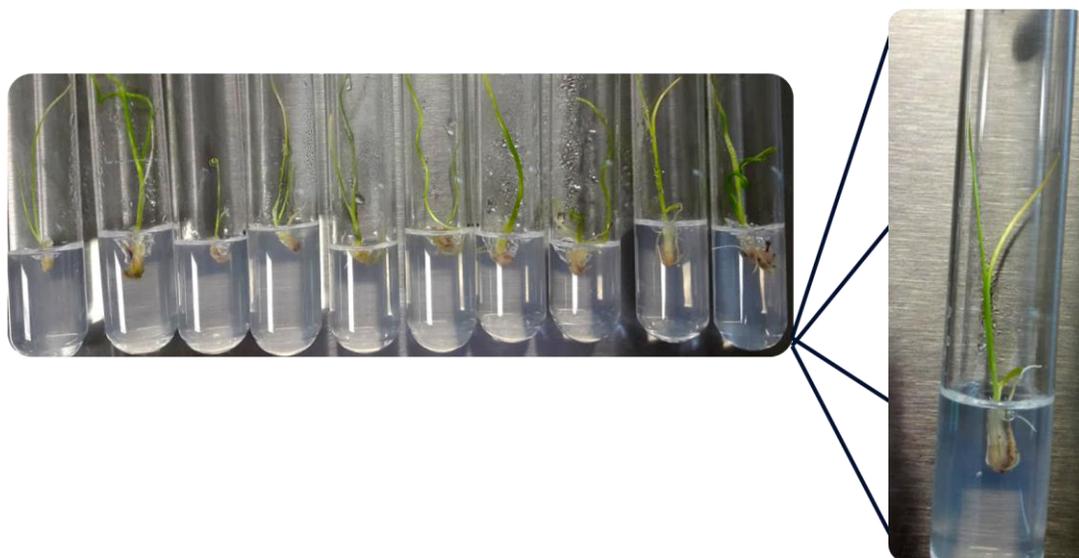


Figura 31. *Allium sativum* L. *in vitro* subcultivados al medio nutritivo MS complementado con citocininas a 40 d con un tamaño aproximado de 9.4 cm.

#### 4.12. Etapa de Enraizamiento de Plántulas *in vitro*

Los explantes subcultivados en medios enriquecidos con citocininas (2-iP, BAP y Kin) lograron inducir el crecimiento radicular en las plántulas regeneradas *in vitro* al presentar diferencia altamente significativa en el factor días es decir si las plántulas permanecían más días en los medios nutritivos presentaban mayor respuesta radicular (Figura 32).

La literatura menciona que si se desea inducir el enraizamiento en explantes de ajo se debe hacer uso de auxinas como el ácido naftalenácetico (ANA) ó ácido indolbutírico (IBA) en concentraciones bajas. En este estudio no fue necesario añadir una auxina al medio nutritivo basto solo usar citocininas lo cual ayudo en la inducción del crecimiento radicular en los explantes. Ayerbe y Sagasta (1990) indican que concentraciones elevadas de citocininas inhiben la formación de raíces, no obstante en este estudio no precisamente inhibió el crecimiento si no al contrario indujo la actividad radicular coincidiendo con lo reportado por Carhuaricra *et al.* (2012) donde mencionan que existe presencia y crecimiento longitudinal de raíces especificando que en menor tamaño si se compara con un medio enriquecido con auxina sin embargo no se inhibe en su totalidad esto es debido a la alta concentración de citocininas (Figura 33).

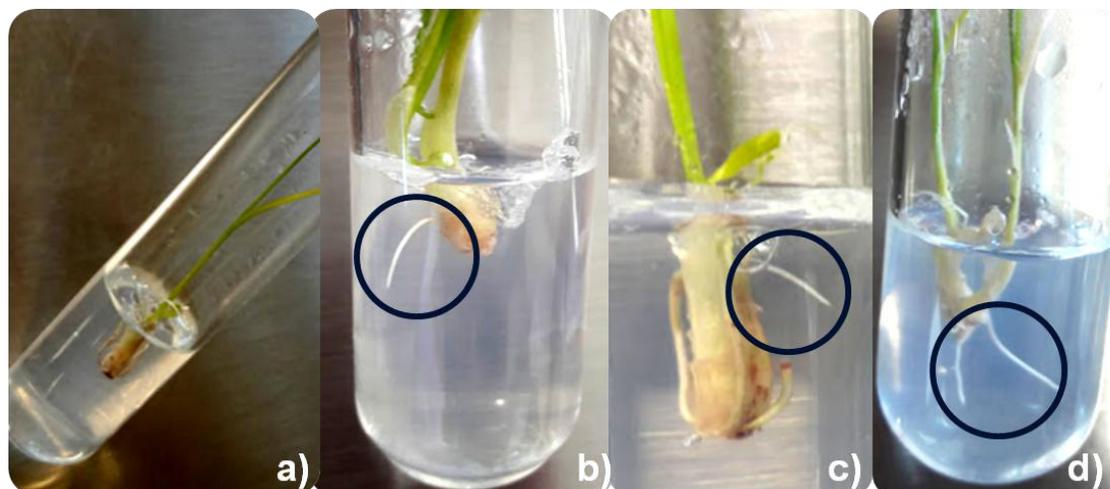


Figura 32. Plántulas regeneradas *in vitro* subcultivadas en las sales básicas del MS en la etapa de enraizamiento, a) *Allium sativum* L. sin crecimiento radicular, b) 20 d del subcultivo formación de una raíz, c) 30 d transcurridos se induce una raíz en el explante, d) 40 d posteriores al subcultivo las plántulas desarrollan dos raíces

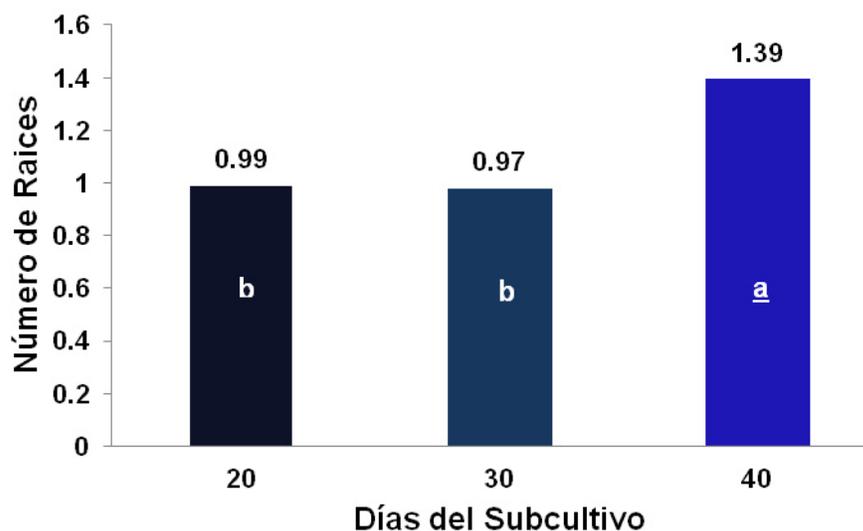


Figura 33. Inducción del crecimiento radicular en plántulas regeneradas *in vitro* subcultivadas en las sales básicas del MS y adicionado con citocininas (2-IP, BAP y Kin) a los 20, 30 y 40 d.

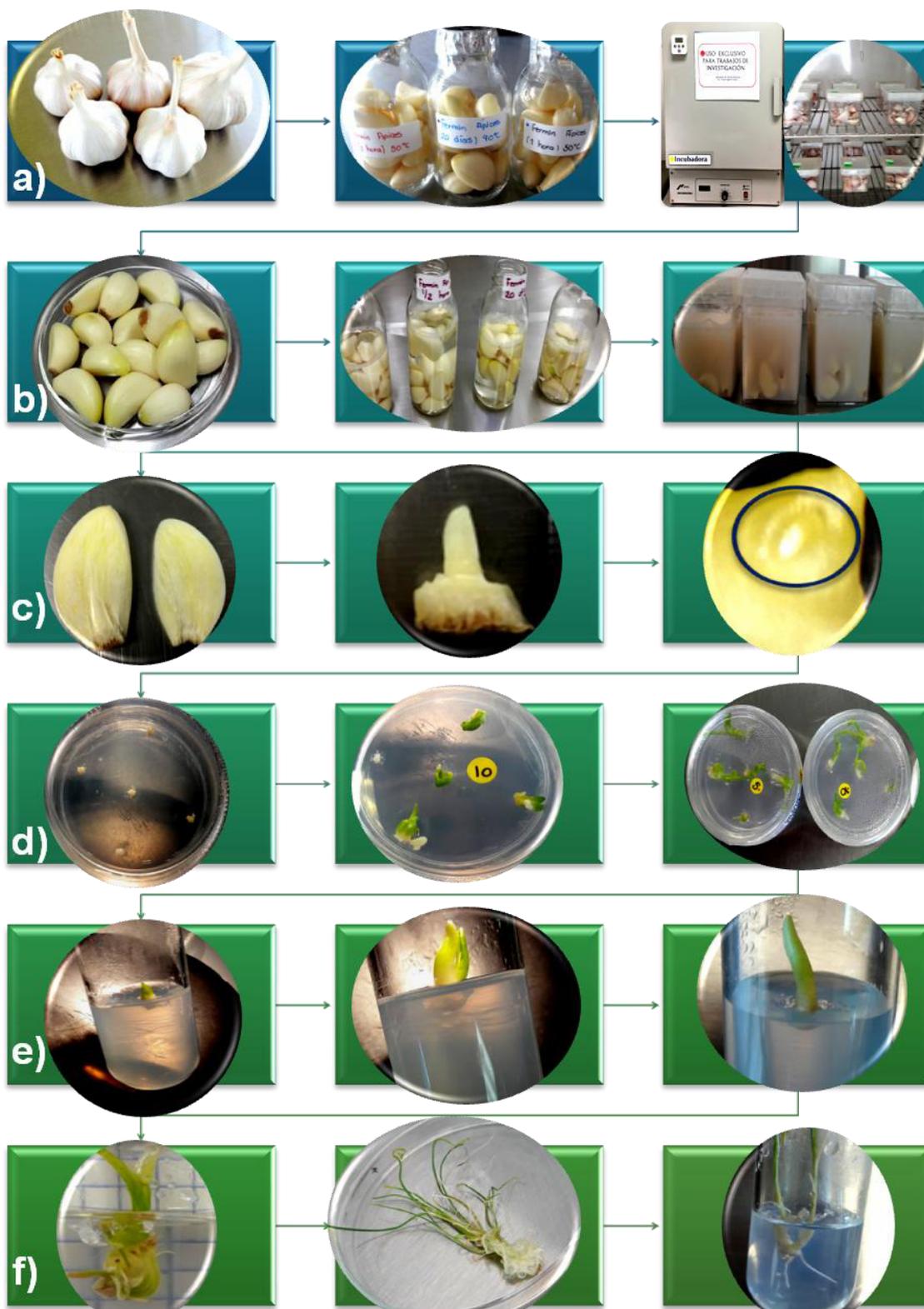


Figura 34. a) Bulbos de *Allium sativum* L. bajo condiciones de termoterapia, b) Predesinfección y desinfección de los bulbillos, c) Extracción de ápice y domo meristemáticos, d) Crecimiento de domos meristemáticos desde el primer día del establecimiento a los 21 d en medio MS, d) Crecimiento de ápices de 0-14 d inoculados en MS, F) Etapa de proliferación de brotes y enraizamiento de las plántulas regeneradas *in vitro* apartir de ápices y domos meristemáticos.

## 5. CONCLUSIONES

Las técnicas de diagnóstico ELISA y RT-PCR dieron como resultado la detección e identificación del virus OYDV en la semilla original del cultivar DF y Tig.

El método de pre-desinfección y desinfección utilizado para el establecimiento *in vitro* en los cultivares Tig y DF fue del 100 % de asepsia obteniendo explantes viables sin presentar oxidación.

Los tratamientos térmicos que se aplicaron a los bulbillos a una temperatura de 40 °C durante 20 y 40 d con explantes de 1 a 2 mm influyo favorablemente en la eliminación del potyvirus OYDV en el cultivar DF. En ápices con un tamaño de 5 a 8 mm se logró eliminar el OYDV a los 40 d de estar incubados a 40 °C. A diferencia del cultivar Tig los cuatro tratamientos térmicos respondieron en la eliminación del OYDV con domos meristemáticos.

Los bulbillos incubados a temperatura de 40 °C alcanzaron una tasa de supervivencia a los 20 d del 75 % y a los 40 d un 65 %. Si los bulbillos se mantiene en calor seco por tiempos más prolongados (>40 días) afecta el crecimiento longitudinal de los explantes. Concluyendo que después de 20 d, el crecimiento de los explantes se disminuye.

La capacidad de regeneración y viabilidad fue mayor en el cultivar Tig siendo el cultivar más resistente al calor seco y húmedo en comparación con el cultivar DF.

El uso de Kin en concentración de  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  dio como resultado el 100 % de inducción de brotes presentando el mayor número a los 20 y 40 .d

El crecimiento radicular se presentó en las plántulas regeneradas *in vitro* a los 20 d sin necesidad de usar auxinas en los tratamientos que fueron enriquecidos con citocininas (2-iP, BAP y Kin).

## 6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las observaciones realizadas durante el transcurso de esta investigación se realizan las siguientes recomendaciones:

- 1) Los tratamientos de termoterapia con tiempo más prolongados expuestos a calor seco son mas efectivos para eliminar el OYDV.
- 2) Los tratamientos de termoterapia de calor húmedo se recomienda que los tiempos sean mayores de una hora para obtener mejores resultados.
- 3) En la eliminación del potyvirus se recomiendan usar domos meristemáticos de un tamaño de 1 a 2 mm.
- 4) En la etapa de establecimiento en las primeras dos semanas no requiere de un regulador de crecimiento y el medio de cultivo más idóneo para sembrar los explantes es en sales basicas del MS con sus vitaminas.
- 5) Los cultivares DF y Tig respondieron favorablemente a los tratamientos sin embargo se recomienda usar el cultivar Tig por que mostró el 100 % de saneamiento en los tratamientos térmicos y al usar el cultivo de meristemas, asi mismo su crecimiento longitudinal no se vio afectado por el calor.
- 6) Se recomienda no usar citocininas para la proliferación de brotes en el cultivar Tig o realizar un estudio con concentraciones más bajas de citocininas.
- 7) Se obtuvo crecimiento radicular sin el uso de auxinas lo que se recomienda no usar auxina en los cultivares DF y Tig.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aiyer A., K. Y. N. 1954. Field Crops of Indian. Mysore. The Bangalore Printing and Pub. Co. Ltd. 5th ed.
- Alvarado M., A. García, y M. Martínez. 2001. Obtención de semillas de ajo (*Allium sativum* L.) libre de patógenos. AP-UAGRO. 5 (1), 3-6.
- Arya M., V.K. Baranwal, Y. S. Ahlawat, and L. Singh. 2006. RT-PCR detection and molecular characterization of onion yellow dwarf virus associated with garlic and onion. Curr. Sci. 91, 1230-1234.
- Ayabe M., and Sumi S. 2001. A novel and efficient tissue culture method -"stem-disc dome culture"- for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep. 20: 503-507.
- Ayerbe M., L.; y Sagasta, J. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editorial Mundi Prensa.
- Bagi F., V. Stojšin, D. Budokov, S. M. A. El Swaeh, and J. Gvozdanovic-Vargaagi. 2012. Effect of onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield components of fall garlic (*Allium sativum* L.) in Serbia. African Journal of Agriculture Research. 7(15), 2386-2390.
- Beyl C.A. 2011. Getting started with tissue culture-media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. (T. R. Gray, Ed.) Plant tissue culture, development and biotechnology. 11-26.

- Bhojwani S.S., and M.K. Razdan. 1996. Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier. 767.
- Bhojwani S.S., and P.K. Dantu. 2013a. Culture Media. Plant Tissue Culture. India. Springer. 27-37.
- Bhojwani S.S., and P.K. Dantu. 2013b. Micropropagation. Plant tissue culture: An introductory text. Springer. 245-274.
- Block E. 2010. Garlic and other *alliums*: The lore and science. Published by The Royal Society of Chemistry. 454.
- Bos L. 1981. Leek yellow stripe virus. Descriptions of plant viruses. 240.
- Bos L. 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. Acta Hort. 127, 11-29.
- Bos L., N. Huijberts, H. Huttinga and D. Z. Maat. 1978. Leek Yellow Stripe Virus and Its Relationships to Onion Yellow Dwarf Virus- Characterization, Ecology and Possible Control. Journal of Plant Pathology. 84, 185-204.
- Brewster J.L., and H.D. Rabinowitch, D. 1990. Onions and Allied Crops. CRC Press, Inc. 3, 109-158.
- Burba J., L. 2008. Los grupos varietales del ajo (*Allium sativum* L.). Contribución para su entendimiento. Horticultura Argentina. 27 (62) 20-27.
- Cabrera C., y P. Elliot. 1996. La cabeza que sólo tiene dientes. Primer encuentro sobre agricultura urbana y su impacto en la alimentación de la comunidad. 1(5), 22-23.
- Cafrune E., E., M. C. Perotto, y V.C. Conci. 2005. Efecto de dos Alelixivirus en el rendimiento de ajo. En Libro de Resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatología. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 561.

- Cafrune E. E., M.C. Perrotto y V. C. Conci. 2006. Effect of two Allxivirus isolates on garlic yield. *Plant Disease*. 90, 898-904.
- Calderón E., R. Serwatowskin, J. Cabrera y C. Gracia. 2013. Siembra mecanizada del ajo: métodos y equipos. *Agrociencia*. 37(5), 483-493.
- Canavelli A., S. F. Nome, y V. C. Conci. 1998. Efecto de distintos virus en la producción de ajo (*Allium sativum* L.) Rosado Paraguayo. *Fitopatología Bras*. 23, 354-358.
- Carhuaricra K., J. Olivera, J. Gonzáles, y J. Rodríguez. 2012. Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad morado Barranquino. *Revista peruana de biología*. 19(3), 341-344.
- Cardoza, V., and L. D'Souza. 2000. Direc somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of cashew. *Phytomorphology*. 50, 201-204.
- Cassells A.C. 2011. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. *Plant tissue culture, development and biotechnology*. 223-238.
- Cavagnaro P., and C. Galmarini. 2007. Garlic. Genome mapping and molecular breeding in plants. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 5, 349-364.
- Charles D.J. 2013. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer Science.
- Chawla H., S. 2009. Introduction to plant biotechnology. Science.
- Chen J., and J. Adams. 2001. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic whit mosaic symptoms in China. *Archives of Virology*. 146, 1841-1853.

- Chen J., J.P. Chen and M.J. Adams. 2002. Characterisation of some carla-and potyviruses from bulb crops in China. *Archives of Virology*. 147, 419-428.
- Choudhury B. 1967. *Bulb Crop Vegetables*. New Delhi: N.B. Trust.
- Conci V., C., A. Canavelli, P. Lunello, J. Di Rienzo, S.F. Nome, G. Zumelzu and R. Italia. 2003. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. *Plant Disease*. 87, 1411-1415.
- Conci V., C., P. Lunello, and Duraschi. 2002. Varations of leek yellow stripe virus Concentration in Garlic and its Incidense in Argentina. *Plant Disease* 86:1085-1088.
- Conci V.C. 1997. Virus y fitoplasmas de ajo. 50 temas sobre producción de ajo, 3, 267-291.
- D. Luis., y R. Aller. 2008. Ajo y riesgo cardiovascular. *Anales de Medicina Interna*. 25 (5), 237-40.
- Davis R.M. 1995. Diseases caused by virus and mycoplasma like organisms. S. H. Mohan, Ed. *Compendium of Onion and Garlic Diseases*, 40-42.
- De Filippis, and L.F. 1999. To mark an end and begin a new era in plant tissu culture. Johnson K.A, Mc Farlane I.J.
- De Filippis, and L. F. 2012. Breeding for biotic stress tolerance in plants. M. Asharaf, M. Ahmad, M. Ozturk, & A. Aksoy, Edits. Springer Science Bussines Media.
- De Filippis, and L.F. 2014. Crop improvement through tissue culture. P. Ahmad, Wani, M.R., Azooz, M.M., Tran, & L.S.P., Edits. New York. Springer.
- Delecolle B., and H. Lot. 1981. Vireses de l'ail: 1.-Mise en evidence et essais de caractérisation par immuunuélectromicroscopie d'un complexe de trois virus chez différents populations d'ail attientes de mosaïque. *Agronomie*. 1, 763-770.

- Dena M. 1997. Efecto de la corriente eléctrica en la eliminación de virus del ajo (*Allium sativum*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 8-16.
- Diekmann M. 1997. FAO/IPGRI. Technical guidelines for the safe movement of germplasm, No.18. *Allium* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International.
- Diniz L. P., L.A. Maffia, O. D. Dhingra, V. W. Casali D., R. H. Santos S., y E. S. Mizubuti G. 2006. Avaliação de Produtos Alternativos para Controle da Requeima do Tomateiro. *Fitopatología Brasileira*. 31, 171-179.
- Dovas C., y C. Volvas. 2003. Viruses infecting *Allium* spp. in southern Italy. *Journal Plant Pathology*, 85-135.
- Dovas C., E. Hatziloukas, R. Salomon, E. Barg, Y. Shibolet, Y.M. and N. Katis. 2001. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *European Journal of Plant Pathology*. 117, 677-684.
- Dutta G., S., and Y. Ibaraki. 2006. *Plant Tissue Culture Engineering. Focus on Biotechnology*. Springer. 6: 480.
- Espín J., y Tomás-Barberán F. 2005. Constituyentes bioactivos no nutricionales de alimentos de origen vegetal y su aplicación en alimentos funcionales. *Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT)*. 139-140.
- Ettienne H., E. Dechamp, D. Barry-Etienne, B. Bertrand. 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18 (1).
- Faccioli G., and F. Marani. 1998. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A, Khetarpal RF, Koganezawa H (eds) *Plant virus diseases control*. APS Press St Paul. 346-380.

- Fajardo T., V. M., M. Nishijima, J. Buso, A. C. Torres, A. C. Ávila, and R.O. Resende. 2001. Identification of potyviruses and carlavirus in Central Brazil. *Fitopatología Brasileira*. (26), 619-626.
- FAO STAT. 2012. Statistics Division. Food and Agriculture Organization. Obtenido de <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- FAO STAT. 2014. Proposal for new work on a codex standard for garlic (Codex Alimentarius Commission, CX/FFV 14/18/10 -AAA.1. January 2014. Recuperado 06 de 2017. [ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccffv18/ff18\\_10\\_addle.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/ccffv18/ff18_10_addle.pdf).
- Friesen N., R.M. Fritsch, and F.R. Blatner. 2006. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* L. (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso*, 22, 372-395.
- Fritsch R., M., and N. Friesen. 2002. Evolution, domestication and taxonomy. In RABINOWITCH D., CURRAH L. (C. Rabinowitch D., Ed.) *Allium Crop Science: Recent Advances*. 5-30.
- García A., C. R. 1998. EL AJO. Cultivo y aprovechamiento. Madrid: Mundi-Prensa. 205.
- García J., y F. Sánchez M. 2000. Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN*. 50(3), 219-29.
- George E., M. Hall, and G.J. Klerk. 2008. Plant growth regulators II: Cytokinins , their analogues and antagonists. M. H. George E., Ed. *Plant propagation by tissue culture*. 205-226.
- Ghaemizadeh F., F. Dashti, G. Khodakaramian, and H. Sarikhani. 2014. Combination of stem-disc dome culture and thermotherapy to eliminate Alexiviruses and

- Onion yellow dwarf virus from garlic (*Allium sativum* cv. *Hamedan*). Arch Phytopathol Plant Protec. (47), 499-507.
- Ghannoum M., A., M. A. Hossain, L. Long, S. Mohamed, G. Reyes, and P.K. Mukherjee. 2004. Evaluation of antifungal efficacy in an optimized animal model of Trichophyton mentagrophytes-dermatophytosis. J Chemother. 16 (2), 139-144.
- Graichen K., and H.U Leistner. 1987. Zwiebelgelbstreifen-Virus (onion yellow dwarf virus) verursacht Knoblauchmosaik. Arch. Phytopatologie Pflanzensch, 23, 165-168.
- Grout B., W.W. 1990. Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. Humana Press Inc.
- Guillén W., A.V., R. Chacón C., y C. Zuñiga V. 2011. Detección del virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV) y el virus latente común del ajo (GCLV) en ajo (*Allium sativum* L.) costarricense. Tecnología en Marcha. 24 (4), 47-58.
- Gull I., A. Noreen, A. Shahbaz, Muhammad, Muhammad, and A. Amin. 2014. Comparative effect of different pytohormones on the micropropagation of *Allium Sativum*. Pak. J. Biochem. Mol. Biol. 47 (1-2), 121-124.
- Gvozdanic-Varga J., M. Vasic, J. Cervenski, and A. Takac. 2009. Evaluation of fall garlic ecotypes for yield and quality. Acta Horticultrae. 830, 173-178.
- Hirochika H. 1993. Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J. 12, 2551-2528.
- Hollings M. 1965. Disease control through virus-fres stock. Ann. Rev. Phytopathology. 3: 367-396

- Iliev I., A. Gajdošová, G. Libiaková, and S. Mohan Jain. 2010. Plant Micropropagation. A. Davey M.R., Ed. Plant Cell Culture Essential Methods, 1-24.
- Instituto Suizo de Bioinformática. 2008. Carlavirus y Potyvirus. [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_protein/230.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/230.html).
- Ishibasi Y., T. Ogawa, and N. Matubara. 1987. Ecological and morphological classification of garlic cultivars (Japanese). Bull. Nagasaki Agric. For. Exp. Stn Sect. Agric.15-95.
- Izquierdo H. 2006. Instructivo técnico para la producción de ajo-semilla de alta calidad fitosanitaria. Temas de Ciencia y Tecnología. 10 (30), 63-71.
- Jain S., M., and D.S. Brar. 2010. Molecular techniques in crop improvement. Springer.
- Kamenetsky R., and H.D. Rabinowitch. 2006. The genus *Allium*: A developmental and horticultural analysis. Horticultural Reviews. 32, 329-378.
- Katis N., V. Maliogka, and C. Dovas. 2012. Viruses of the Genus *Allium* in the Mediterranean Region. Advances in Virus Research. 84, 163-208.
- Kehr. 2002. Origen del cultivo de ajo. Obtenido de <http://www.inia.pdf>.
- Keusgen M. 2002. Health and *Alliums*. L. C. Rabinowitch H.D., Ed. 357-378.
- King A., M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz. 2011. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press.
- Klukáčkova J., M. Navrátil, and M. Duchoslav. 2007. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. Journal Plant Disease. 114 (3), 97-100.

- Koch M., and R. Salomón. 1994. Serological detection of onion yellow dwarf virus in garlic. *Plant Disease*. 78, 785-788.
- Ledezma E., and R. Apitz C. 1998. Del folklore al mecanismo molecular: el ejemplo de ajo *Interciencia*. 23 (4), 227-31.
- Leisner S., M., and S. H. Howell. 1993. Long-distance movement of viruses in plants. *Trends Microbiol.* 1, 314-317.
- Leisova-Svobodova L., and K. Karlova-Smekalova. 2011. Detection of garlic viruses using SYBR green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journals Phytopathology*. 159, 429-434.
- Linsmaier E., M., and F. Skoog. 1965. The use of antioxidants as rooting enhancers in the Geraniaceae. *Physiologia Plantarum*. 18, 100-127.
- López M., T. 2007. El ajo, propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *OFFARM*. 26 (1), 79-81.
- Lot H., V. Chovelon, S. Souches, and B. Delecolle. 1998. Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Virus on symptomatology and yield loss of three French Garlic Cultivars. *Plant Diseases*. 82 (12), 1381-1385.
- Loyola-Vargas, V.M., y F. Vázquez-Flota. 2006. An introduction to plant cell culture: Back to the future. Springer. *Methods in Molecular Biology*. 318:3-8
- Lucas W., J., and R. L. Gilbertson. 1994. Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annu Rev Phytopathol*. 32, 387-411.
- Lunello P., C. Mansilla, V.C. Conci, and F. Ponz. 2004. Ultra-sensitive detection of two garlic potyviruses using real-time fluorescent (Taqman (R)) RT-PCR assay. *Journal Virology Meth.* 118, 15-21.

- Lunello P., C. Perotto, S. Nome, y V. Conci. 2001. Efecto del Leek yellow stripe virus (LYSV) y del complejo viral en el cultivo de ajo. *Fitopatología Brasileira*. 26, 541.
- Lunello P., D. Ducasse, and V. Conci. 2005. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*, 112, 371-378.
- Lunello P., J.D. Rienzo, and V.C. Conci. 2007. Yield loss in garlic caused by Leek yellow stripe virus Argentinean isolate. *Plant Disease*. 91, 153-158.
- Lunello P., S. Nome, and V. Conci. 1999. Resultados preliminares sobre el efecto del leek yellow stripe virus (LYSV). MXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. 226.
- Maab H.I., and M. Klaas 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozymes and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 91, 89-97.
- Macias V., L. M. y L. H. Maciel P. 2015. Tecnología para la producción de ajo en Aguascalientes. INIFAP. Folleto para Productores (ISBN:978-607-37-0471-7). 47-44.
- Mahmoud S., Y.M., S.A. Abo-El Matty, A.M. El-Borollosy, and M.H Abdel-Ghaffar. 2008. Identification of onion yellow dwarf potyvirus as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. *International Journal of Virology*. 4 (1), 1-13.
- Majudmer S., V.K. Baranwal, and S. Joshi. 2008. Simultaneous detection of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. (E. E. Pisa, Ed.) *Journal of Plant Pathology*. 90 (2), 371-374.

- Majudmer S. and V.K. Baranwal. 2014. Simultaneous detection of four garlic viruses by multiplex reverse transcription PCR and their distribution in Indian garlic accessions. *Journal of Virological Methods*. 202:34-38.
- Mc Collum G.D. 1976. Onion and allies; *Allium* (Liliaceae). Evolution of crop plants. 186-190.
- Melhus I. E., C. Ready, W.J. Shenderson, and E. Vestal. 1929. A new virus disease epidemic on onions. *Phytopathology*. 73-77.
- Messiaen C.M. 1974. *Las Hortalizas Primera ed.* Blume.
- Metwally E., M. El-Denary, A. Omar, Y. Naidoo, and Y. Dewir. 2012. Bulb and vegetative characteristics of garlic (*Allium Sativum* L.) from *in vitro* culture through acclimatization and field production. *African Journal of Agricultural Research*. 7 (43), 5792-5795.
- Mroginski L., P. Sansberro, y E. Flaschlan. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. E. V. Levitus G., Ed. Argentina. Argen Bio INTA. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. 17-25.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*. 25, 135-166.
- Murashige T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*. 15, 473-215.
- Murphy D., J. 2007. *Plant breeding and biotechnology: societal context and the future of agriculture*. Cambridge University Press.
- Navarro C. 2007. Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Fitoterapia*, 7(2), 132-135.

- Neuman K., H., and A.T. Kumar. 2009. Plant cell and tissue culture-a tool in biotechnology. Science.
- Ochoa Y., M., E. Cerna, G.Gallegos, J. Landeros, J. C. Delgado, y S. Hernández. 2012. Identificación de especies de fusarium en semilla de ajo en Aguascalientes. Revista Mexicana de Micología. 36 (1), 27-31.
- Olivera S., J. 2009. Técnica de producción de semilla genética y básica de ajo (*Allium sativum* L.) libre de virus. Serie Folleto N° 6-09, 2-10.
- Olmedo P. 2010. Estudio de diferentes fracciones y extractos de *Allium sativum* sobre la reactividad vascular, niveles de colesterol y cultivos celulares. Revista Eureka. 1 (1), 8-40.
- Olmos S., G. Luciani, y E. Galdeano. 2010. Micropropagación. E. V. Levitus G., Ed. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. 353-362.
- Paludan N. 1980. Virus attack on leek: survey, diagnosis, tolerance of varieties and winterhardiness. Tidsskr. Planteavl. 84, 371-385.
- Panattoni A., A. Luvisi, and E. Triolo. 2013. Review. Elimination of virus in plants: twenty years of progress. Spanish Journal of Agricultural Research.
- Pardo A., F. Luna, y N. Hernández. 2011. Regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. Bioagro. 23 (3), 207-214.
- Pardo R. A., y R.C. Marin. 2003. Clasificación de cultivares de ajo por método de análisis multivariado. Agronomía Tropical. 53, 10-21.
- Park K. S., Y.J. Bae, E. J. Jung, and S. J. Kang. 2005. RT-PCR-based detection of six garlic viruses and their phylogenetic relationships. Journals Microbiology Biotechnology. 15, 1110-1114.

- Parrano L., M. Afunian, D. Pagliaccia, G. Douhan, and G. Vidalakis. 2012. Characterization of viruses associated with garlic plants propagated from different reproductive tissues from Italy and other geographic regions. *Phytopathol Mediterr.* 51, 549-565.
- Peña-Iglesias A. 1988. El ajo: virosis, fisiopatías y selección clonal y sanitaria. II Parte científico-experimental. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas.* 14, 493-533.
- Pérez L., M.J. Navarro, B. Mendoza, y R. Ramirez. 2010. Evaluación de rendimiento de compuestos de ajo tipo Taiwán. *Acta Universitaria.* 20 (3): 63-69.
- Pérez J., N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Pérez M., C. 2007. Identificación de virus fitopatógenos en ajo (*Allium sativum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 25, 11-17.
- Pérez M., L., E. Rico J., y J.R. Sánchez-Palé. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 22 (2), 187-197.
- Pérez M., L., M.R. Ramírez y G.J.G. Salinas. 1997. Métodos de obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) libres de virus (grupo potyvirus) en México. Libro de Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Montevideo, Uruguay. Resumen. 198.
- Pérez-Moreno L., D. Santiago-Gómez, E. Rico-Jaramillo, R. Ramírez-Malagón, y B. Mendoza-Celedón. 2008. Efecto de virus sobre características agronómicas y calidad del ajo (*Allium sativum* L.), en el estado Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 26, 40-48.

- Perrotto M., C., V.C. Conci, E.E. Cafrune, P. Alochis, and R. Bracamontes. 2010. The effect of assitional viral infections on garlic plants initially infected with Allexivirues. Eur Journal Plant Pathology. 126, 489-495.
- Perrotto M., C., V.C. Conci, E.E. Cafrune, P. Alochis, and R. Bracamontes. 2003. Differences in the responses of garlic cultivars to the eradication. Phyton Int J Exp Bot. 233-240.
- Preece J.,E., E. G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. Micropropagation. Kluwer Academic Publishers.71-93
- Quintana S., E. M., A. Robledo P., A. Santacruz V., A. M. Gutiérrez E., G. Carrillo C., y J. L. Cabrera P. 2005. Regeneración *in vitro* de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). Agrocienca. 647-655.
- Ramírez-Malagon., R., A. Borodanenko, M.L. Pérez, and J.G. Salinas. 2006. Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 86, 103-110.
- Ramírez-Concepción H. R., L. N. Castro-Velasco, y E. Martínez-Santiago. 2016. Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium sativum*). Salud y Administración. 3(8), 39-47.
- Reveles-Hernandez M., R. Velázquez-Valle, y A. G. Bravo-Lozano. 2009. Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 11, 272.
- Rivlin R. S. 2001. Historical perspective on the use of garlic. Journal of Nutrition, 131, 951S-954S.
- SAGARPA. 2016. <http://oiapes.sagarhpa.sonora.gob.mx/paq-tec/paq-ajo.pdf>

- SAGARPA. 2017. Aumenta producción de ajo "Hecho en México" 28.9 por ciento en 2016. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/zacatecas/boletines/Paginas/2017B096.aspx>
- Sako I. 1989. Occurrence of garlic latent virus in *Allium* species. *Plant Prot. Soc.* 43, 389-392.
- Salomón R. 2002. Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plants. *Agricultural Research.* 312-327.
- Salunkhe D. K., and B.B. Desai. 1984. *Postharvest Biotechnology of Vegetables.* CRS Press. 1.
- Sánchez T. 1995. Evaluación del efecto de filtrados tóxicos de *Sclerotium cepivorum* sobre callos y microbulbillos "*in vitro*" de *Allium Sativum* L. En *P. Agronomía.* Tesis de Maestría. 99. Maracay.
- SIAP. 2016. Avance de Siembras y Cosechas. Resumen por Cultivo. Obtenido de [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenDelegacion.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do)
- Singh V. K., and D.K. Singh. 2008. Pharmacological effects of garlic (*Allium sativum* L.). *Annual Review of Biomedical Sciences.* 10, 6-26.
- Spiegel S., E. A. Frison, and R.H. Converse. 1993. Recent development in therapy and virus-detection produceres for international movements of clonal plant germ plasm. *Plant Dis.* 77, 176-180.
- Suttle G., R. L. 2011. Commercial laboratory production. T. R. D.J., Ed. *Plan tissue culture, development and biotechnology.* 213-221.
- USDA. 2006. Garlic Origins. Obtenido de <http://www.fao.org/in-action/inpho/en/#USDA>

- Yam W., T., and J. Arditti. 2009. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. Springer. Plant Biotechnology Reports. 3:1-56
- Van Dijk P. 1993. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. Neth Journal Plant Pathology. 99, 233-257.
- Van Dijk P. 1994. Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. Acta Horticulturae. 358, 299-306.
- Van Dijk P., and R. A. A. Van der Vlugt. 1994. New mite-borne virus isolates from rakkyo, shallot and wild leek species. Eur. Journals Plant Pathology. 100, 269-277.
- Van Dijk P., M. Verbeek, and L. Bos. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated allium species and their classification into two new rymoviruses en the family potyviridae. Netherlands Journal of Plant Pathology. 97 (6) 381-399.
- Van Regenmortel, M., C., Fauquet, D. Bishop, E. Carstens, and M. Estes. 2000. Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Academic Press. 1162.
- Varés M., L., E. Correa H., C. Iglesias G., y D. Palmero Ll. 2009. Viabilidad de los ajos destinados a producción (Efectos de la temperatura). Agricultura de la Universidad de Ingeniería Técnica Agrícola de Madrid. 12-14.
- Vieira R. L., A. Lima da S., G. R. Zaffari, D. A. Steinmacher, H. P. de Freitas F., and M.P. Guerra. 2015. Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. Acta Physiology Plant. 37, 1733.
- Vishnichenko V.K., T.N. Konareva, and S.K. Zavriev. 1993. A new filamentous virus in shallot. Plant Pathology. (42), 121-126.

- Walkey D., G.A. 1990. Virus diseases. (R. H.-L. Brewster, Ed.) "Onion and allied crops". 2, 191-212.
- Walkey D., G. A., M. J. Webb, C.J. Bolland, and A. Miller. 1987. Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. J. Hortic Sci. 62, 211-220.
- Wang Q., W.J. Cuellar, M. Rajama K., Y. Hirata, and P.T. Valkonen J. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Mol Plant Pathol. 9, 237-250.
- Wang Y., L. Zhang, R. Moslehi, J. Ma, K. Pan, and T. Zhou. 2009. Garlic or micronutrient supplementation, but not anti-Helicobacter pylori therapy, increases serum folate or glutathione without affecting serum vitamin B-12 or homocysteine in a Rural chinese population. J Nutricion. 139 (1), 106-112.