



Métodos físicos para reducir inóculo de *Sclerotium cepivorum* en semilla de ajo morado (*Allium sativum* L.)¹

Physical methods to reduce the inoculum of *Sclerotium cepivorum* in purple garlic seed (*Allium sativum* L.)

Magda Rocío Gómez-Marroquín², Diana Marcela Torres-Jiménez², Ginna Natalia Cruz-Castiblanco²,
Anngie Katherine Hernández-Guzmán², Sadao Kobayashi², Andrea del Pilar Villarreal-Navarrete²

- ¹ Recepción: 15 de marzo, 2021. Aceptación: 13 de julio, 2021. Este trabajo se desarrolló dentro del proyecto de investigación “Generación de componentes tecnológicos para el control de pudrición blanca en aliáceas”, ejecutado por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), con recursos de la transferencia variable año 2018, del Ministerio de Agricultura del Gobierno de Colombia.
- ² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. mrgomez@agrosavia.co (autor para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0002-7487-0805>); dmtorres@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0001-8131-3890>); gcruz@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0003-2355-4914>); akhernandez@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0001-6596-4765>); skobayashi@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0003-0391-0715>); avillarreal@agrosavia.co (<https://orcid.org/0000-0001-9580-6936>).

Resumen

Introducción. En Colombia, la producción de ajo se ve afectada por patógenos, principalmente *Sclerotium cepivorum*, el cual se disemina por el material de siembra. Es necesario establecer tecnologías de bajo costo que permitan controlar este patógeno. **Objetivo.** Evaluar dos métodos de termoterapia, termoterapia por calor seco y termoterapia por inmersión en agua, para disminuir la presencia de *S. cepivorum* en semilla de ajo y su efecto sobre características agronómicas de plantas emergidas a partir de bulbillos tratados. **Materiales y métodos.** Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), ubicado en Cundinamarca, Colombia, durante el primer semestre del 2019. Se evaluaron nueve tratamientos; cinco en termoterapia por calor seco: 35 °C por 12 h, 35 °C por 129,6 h, 50 °C por 48 min, 5 °C por 20 días, 38 °C por 1 h; dos en termoterapia por inmersión en agua caliente: 48 °C por 30 min, 50 °C por 20 min y dos controles: desinfección química (tebuconazol) y temperatura ambiente (20 °C por 20 días), en un diseño en bloques completos al azar. Se evaluó brotación de bulbillos y crecimiento de las plantas de ajo después de aplicar termoterapia a la semilla y viabilidad de esclerocios de *S. cepivorum*. **Resultados.** El almacenamiento de la semilla a 5 °C por 20 días aceleró su brotación, alcanzó una germinación de 80 % a los cinco días, mayor número de hojas y acumulación de biomasa. La germinación de esclerocios estuvo entre 33 y 67 %; el tratamiento que presentó la menor incidencia fue 35 °C por 129,6 h (33 %). **Conclusión.** El tratamiento de termoterapia por calor seco a 35 °C por 129,6 h mostró potencial en la reducción del inóculo de *S. cepivorum* en semillas de ajo.

Palabras clave: control de enfermedades, bulbo, Alliaceae, desarrollo biológico, termoterapia.



Abstract

Introduction. In Colombia, garlic production is affected by pathogens, mainly *Sclerotium cepivorum*, which is disseminated by planting material. It is necessary to establish low-cost technologies to control this pathogen. **Objective.** To evaluate two thermotherapy methods, dry heat thermotherapy and water immersion thermotherapy, to reduce the presence of *S. cepivorum* in garlic seed and its effect on agronomic characteristics of plants emerged from treated bulbs. **Materials and methods.** This work was carried out at the Tibaitata Research Center of Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), located in Cundinamarca, Colombia, during the first semester of 2019. Nine treatments were evaluated; five in dry heat thermotherapy: 35 °C for 12 h, 35 °C for 129,6 h, 50 °C for 48 min, 5 °C for 20 days, 38 °C for 1 h; two in hot water immersion thermotherapy: 48 °C for 30 min, 50 °C for 20 min, and two controls: chemical disinfection (tebuconazol) and room temperature (20 °C for 20 days) in a randomized complete block design. Sprouting of bulbs and growth of garlic plants after applying thermotherapy to the seed and viability of *S. cepivorum* sclerotia were evaluated. **Results.** Seed storage at 5 °C for 20 days accelerated its sprouting, reached a 80 % germination after five days, increased leaf number and biomass accumulation. Sclerotia germination was between 33 and 67 %; the treatment that presented the lowest incidence was 35 °C for 129,6 h (33 %). **Conclusion.** Dry heat thermotherapy treatment at 35 °C for 129,6 h showed potential in reduction of *S. cepivorum* inoculum in garlic seeds.

Keywords: disease control, bulb, Alliaceae, biological development, thermotherapy.

Introducción

El cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) alcanzó a nivel mundial, para el año 2018, 28,4 millones de toneladas de producción, con rendimientos de 18 t ha⁻¹ (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2020). En este mismo año, se reportó la siembra de ajo en Colombia de 830 hectáreas (ha), con producciones de 10 175 t y rendimientos de 13,08 t ha⁻¹ (Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano, 2020), destacándose la producción a lo largo de la zona andina colombiana en los departamentos de Nariño, Norte de Santander, Santander y Cundinamarca.

El origen del material de siembra usado como semilla de propagación asexual (bulbillos de ajo) en el país, en su mayoría es de origen peruano, que es introducido sin controles fronterizos, lo que afecta el estatus fitosanitario del país, debido a que promueve el establecimiento y diseminación de distintos patógenos y fisiopatías (Prato-Sarmiento, 2016). Existen cuatro grupos ecofisiológicos de ajo: Grupo I (violetas o asiáticos), Grupo II (morados), Grupo III (rosados y blancos) y Grupo IV (colorado y castaño) (Escobar et al., 2012). De esta clasificación se han derivado algunas denominaciones comerciales, aceptadas internacionalmente. La correspondencia dentro de los grupos ecofisiológicos responde a la coloración de las catáfilas (hojas de protección de los bulbos) (Burba, 2003).

El ajo es una especie apomíctica y todos los cultivares son estériles, la reproducción es vegetativa, por medio de bulbillos que sirven como material de propagación (Atif et al., 2020). Esta condición favorece la diseminación, acumulación e incremento de las enfermedades sistémicas entre las que se destacan las causadas por *Puccinia allii*, *Puccinia porri*, *Sclerotium cepivorum*, *Peronospora herbarum* y *Botrytis cinerea*; por virus de los géneros potyvirus, carlavirus y allexivirus y por el nemátodo *Ditylenchus dipsaci* (Zapata-Narváez et al., 2020), transmitidos por semilla y a los que se les atribuyen disminución en los rendimientos (Fayad-André et al., 2011).

La pudrición blanca en ajo, cuyo agente causal es el hongo *Sclerotium cepivorum*, es una enfermedad limitante y de importancia económica para el cultivo; se estima que puede generar pérdidas de hasta el 100 % de la producción de bulbillos (McLean et al., 2005; Velásquez-Valle & Reveles-Hernández, 2016). Este hongo contamina

los suelos y limita la producción de aliáceas en el mismo terreno hasta por treinta años (Ulacio et al., 2006) e induce la migración de los productores a otras zonas de producción.

La baja disponibilidad de semilla de ajo con calidad sanitaria y agronómica, y la inexistencia de variedades mejoradas, limita la producción de ajo en el país. Bajo este panorama, y tras la dependencia de productos químicos en el manejo de enfermedades en el cultivo, surge la necesidad de contar con alternativas de manejo económicas, viables y compatibles con el ambiente, que generen un control de microorganismos patogénicos en semilla y disminuyan así el impacto sobre el rendimiento del cultivo. A nivel mundial, se han evaluado varias estrategias para el control de enfermedades, con moléculas químicas de baja toxicidad, biocontroladores, compostajes, sustancias quitinosas, extractos vegetales, procesos físicos y químicos de desinfección de la semilla, entre otros (Mishra et al., 2014).

Dentro de las estrategias de control físico para el control de patógenos en el material de siembra, se encuentra la termoterapia, tratamientos térmicos e hídricos que permiten la eliminación de contaminantes sistémicos (Suárez Padrón, 2020). El fundamento del método es que las enfermedades solo pueden desarrollarse y sobrevivir dentro de ciertos límites de intensidad de factores físicos ambientales, más allá de los límites mínimos y máximos, las condiciones resultan letales. Los límites cambian según los patógenos, para una misma especie y según su estado de desarrollo. Además, la interacción con las intensidades de los otros factores ambientales y con el estado fisiológico del microorganismo también afectan los límites de cada factor. Se han establecido como agentes físicos activos a la temperatura alta y/o baja, mediante choques térmicos para la destrucción directa de organismos, el aire seco, las longitudes de onda de luz desfavorables, vaporización, solarización y algunos tipos de radiación ionizante, para producir esterilizaciones (Agrios, 2005).

Se afirma que la termoterapia es un método efectivo para la erradicación de patógenos (bacterias, virus, hongos, nematodos y fitoplasmas) en semillas como el ajo (Varés Megino et al., 2009). Una de las estrategias de manejo cultural propuestas para el control físico de *S. cepivorum*, es la solarización del terreno, para mantener el suelo a 35 °C por un periodo mayor a 5 días; con esta labor se logra reducir la viabilidad del 50 % de los esclerocios del patógeno (Granados, 2005). En bulbillos de ajo cosechados expuestos a temperaturas por debajo de 5 °C y por encima de 40 °C, se demostró la reducción en crecimiento micelial de *Fusarium proliferatum*, lo que indica que los tratamientos térmicos pueden ser usados para reducir la carga de microorganismos patogénicos del material de siembra (Palmero et al., 2013). La temperatura y la baja humedad afectan la supervivencia de los esclerocios de *S. cepivorum* y es posible alcanzar la dosis letal media a una temperatura de 35 °C durante 129,6 h (Zúñiga-Mendoza, 2013), debido además a la colonización de los esclerocios por parte de microorganismos, los cuales fueron reportados por McLean et al. (2001). Si la temperatura aumenta a los 50 °C, se requieren solamente de 0,8 h para lograr el mismo efecto (Capuz-Bravo, 2013). Este hongo es más sensible al calor que otros que producen esclerocios, por ejemplo, *Sclerotinia minor* tiene una DL 50 de 624 h a 35 °C. Se ha utilizado termoterapia, con base en altas temperaturas en forma directa sobre las cabezas de ajo, la cual ha sido efectiva para reducir la carga viral del material de siembra acompañada por cultivo de meristemas, pero es necesario hacer una selección cuidadosa de la temperatura y tiempo de tratamiento para no afectar la capacidad de germinación ni comprometer su posterior desarrollo (Velasquez-Valle et al., 2017).

Se ha usado la termoterapia para homogenizar la brotación de los bulbillos de ajo, los cuales pasan por un estado de vernalización después de la cosecha que en condiciones invernales se presenta para soportar las bajas temperaturas de las regiones de donde es originario (Burba, 2007). Someter los bulbillos a un proceso de frigioinducción en regiones sin estacionalidad, como las regiones tropicales, permite acelerar la brotación de los bulbillos. Se ha demostrado que el almacenamiento de la semilla de ajo a temperaturas alrededor de 5 °C, por periodos de 20 días, mejora la producción y crecimiento de las hojas, reduce el período de crecimiento y promueve la producción de bulbillos por bulbo; sin embargo, el rendimiento del bulbo de ajo y el peso medio del bulbo disminuyen con el aumento del período de tratamiento de enfriamiento (Wu et al., 2016).

El objetivo de este trabajo fue evaluar dos métodos de termoterapia, por calor seco y por inmersión en agua, para disminuir la presencia de *S. cepivorum* en semilla de ajo y su efecto sobre características agronómicas de plantas emergidas a partir de bulbillos tratados.

Materiales y métodos

Localización

Este trabajo se realizó durante el primer semestre de 2019, en los invernaderos y Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigación Tibaitatá de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), ubicado en el departamento de Cundinamarca, Colombia a una latitud 4° 41' 21,96" N y longitud 74° 12' 6,08" O.

Material vegetal

Se usaron bulbillos de ajo (*A. sativum*) con 2,5 meses de secado poscosecha. El ecotipo de ajo utilizado en este ensayo se encuentra clasificado dentro del grupo ecofisiológico II, conocido comercialmente como ajo morado, que corresponde a un material con catáfilas castaño claro (Burba, 2003).

Evaluación de la aplicación de termoterapia a la semilla asexual de ajo sobre el desarrollo de las plantas

Aplicación de termoterapia a semilla asexual de ajo

Se usaron bulbillos de ajo morado (*A. sativum*) con 2,5 meses de secado poscosecha. Los bulbillos tratados en termoterapia con calor seco a temperaturas por encima de los 35 °C, se colocaron en bolsas de papel en una cámara de flujo laminar (CHBbiolus®-Korea) y en una nevera (Haceb®-México) a 5 °C los bulbillos tratados a baja temperatura. El tratamiento de termoterapia por inmersión en agua caliente se realizó al sumergir los bulbillos, dispuestos en bolsas de muselina, en agua precalentada a la temperatura indicada en un baño maría (Mermmet®-Germany), esta condición se mantuvo durante el periodo determinado en cada caso. Se contó con dos controles: a) desinfección química tradicional empleada por agricultores, consistente en la inmersión de la semilla por 12 h en una solución de fungicida tebuconazol (3 g l⁻¹) a temperatura ambiente y b) temperatura ambiente 20 ±2 °C y humedad relativa promedio de 60 % en oscuridad por veinte días sin ninguna desinfección (Cuadro 1).

Evaluación del índice visual de dormancia (IVD)

Los bulbillos de ajo morado usados en el ensayo, contaban con 2,5 meses de secado poscosecha. Se realizó un muestreo de manera aleatoria con veinte bulbillos del lote total de semilla (1 kg), los cuales se cortaron longitudinalmente para observar la longitud de la hoja de brotación y calcular el índice visual de dormición (IVD) de acuerdo con la metodología, propuesta por Burba (2003) (Figura 1). Este permite evaluar las condiciones de almacenamiento y la respuesta a la conservación del ajo, de acuerdo con la relación entre la longitud de la hoja de brotación (B) y la hoja de reserva del bulbillo (R) (ecuación 1):

$$IVD (\%) = \frac{B}{R} \times 100 \quad [1]$$

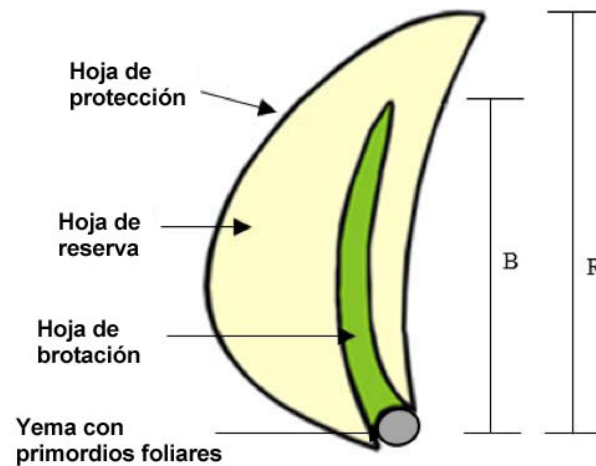


Figura 1. Corte longitudinal del bulbo de ajo morado (*A. sativum*) para mostrar la relación de tamaño entre la hoja de brotación (B) y la hoja de reserva (R). Adaptado de Burba (2003).

Figure 1. Longitudinal section of the purple garlic (*A. sativum*) bulb to show the size relationship between the sprouting leaf (B) and the reserve leaf (R). Adapted from Burba (2003).

Cuadro 1. Tratamientos de termoterapia usados en semilla de ajo morado (*A. sativum*) para observar efecto sobre crecimiento y desarrollo de las plantas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

Table 1. Thermotherapy treatments used on purple garlic (*A. sativum*) seed to observe effect on growth and development of plants. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

Tratamiento	Termoterapia	Temperatura (°C)	Tiempo	Referencia
T1	Calor seco	35	12 h	Zuñiga-Mendoza (2013)
T2	Calor seco	35	129,6 h	Zuñiga-Mendoza (2013)
T3	Calor seco	50	48 min	Capuz-Bravo (2013)
T4	Calor seco	5	20 días	Wu et al. (2016)
T5*	Inmersión en agua	38	1 h	Perea M, Comunicación personal, 18 de septiembre, 2017
T6*	Inmersión en agua	48	30 min	Perea M, Comunicación personal, 18 de septiembre, 2017
T7	Inmersión en agua	50	20 min	Perea M, Comunicación personal, 18 de septiembre, 2017
T8	Desinfección química		12 h	
T9	Control ambiente	20 ± 2	20 días	

* 2 veces al día (mañana-tarde) durante 2 días. / * 2 times a day (morning-afternoon) for 2 days.

Previo a la siembra y después de aplicar el tratamiento de limpieza física, se tomaron cuatro bulbillos de ajo morado de cada tratamiento a los que se les realizó un corte longitudinal y se calculó el IVD de acuerdo con la metodología mostrada en la Figura 1. Para evaluar esta variable se contó con un diseño completamente al azar, en donde los bulbillos muestreados componían las unidades experimentales en cada uno de los tratamientos.

El IVD es un valor que permite tomar decisiones de siembra, el cual debe superar el 70 % para garantizar una óptima brotación de los bulbillos.

Efecto de termoterapia sobre brotación de bulbillos de ajo y crecimiento de las plantas

El suelo usado en el ensayo fue autoclavado y se confirmó la ausencia de patógenos de suelo a través de diluciones seriadas y siembra en agar nutritivo y en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), sin observar crecimiento de microorganismos que pudieran comprometer el estado sanitario de las semillas de ajo. Los bulbillos de ajo morado termotrados se sembraron en este suelo, dentro de contenedores plásticos con capacidad de 15 kg, bajo condiciones de invernadero, humedad relativa de 60 % y temperatura promedio de 28 ± 2 °C. Se realizó riego a demanda, fertilización edáfica consistente en la mezcla en sustrato de 1 g de DAP (fosfato diamónico) y 0,5 g de urea por 5 kg de suelo en presiembra y aplicaciones de fertilizante foliar completo a una dosis de 1 mL L⁻¹ a los dos y tres meses después de siembra.

El ensayo se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con nueve tratamientos, tres repeticiones técnicas y tres repeticiones en el tiempo. Se realizaron muestreos destructivos, con base en tres plantas por repetición, se midió el porcentaje de brotación, el número de hojas y la masa seca del bulbo a los 15, 30, 60, 90, 120 y 150 días después de siembra (dds). La masa seca se determinó tras secar el material vegetal a 60 °C por 48 h.

Evaluación de la aplicación de termoterapia para disminuir el inóculo de *S. cepivorum* en semilla asexual de ajo

*Inoculación de bulbillos de ajo con *S. cepivorum**

Los bulbillos de ajo morado se sumergieron en agua durante 24 h para acelerar el desarrollo de raíces. El patógeno utilizado correspondió al aislamiento S10 de *S. cepivorum* aislado por Zapata-Narváez et al. (2020) de cultivos de ajo visitados en el año 2019 en el departamento de Cundinamarca, Colombia. Los esclerocios se cosecharon de medio PDA (PDA Oxoid®), con 24 días de crecimiento. Se colocaron cinco esclerocios sobre las raíces de los bulbillos de ajo. Los bulbillos infestados se incubaron a 18 °C en oscuridad hasta observar germinación de los esclerocios. La germinación de los esclerocios sobre las raíces se observó doce días después de inoculación.

*Aplicación de termoterapia a bulbillos de ajo infectados con *S. cepivorum**

Los bulbillos inoculados con el aislamiento S10 de *S. cepivorum* se sometieron a los tratamientos de termoterapia. Hubo ocho tratamientos, cinco de ellos en los que se aplicó termoterapia por calor seco en los rangos de temperatura y tiempo descritos en el Cuadro 2, un tratamiento con desinfección química por 12 h a temperatura ambiente (20 ± 2 °C), un control con bulbillos de ajo inoculados con *S. cepivorum* y almacenados a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) por veinte días y un control absoluto en el que no se inocularon los bulbillos con los esclerocios del patógeno y se almacenaron a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) por veinte días.

De acuerdo con los resultados obtenidos del efecto de los tratamientos de termoterapia e hidroterapia sobre la brotación de los bulbillos de ajo, se seleccionaron los tratamientos de calor seco a ser aplicados sobre los bulbillos infectados con *S. cepivorum*, para poder evaluar así la eficiencia del tratamiento sobre el patógeno. Sin embargo, se conservó la temperatura y el tiempo de exposición de uno de los tratamientos de termoterapia por inmersión en agua caliente para ser aplicado como calor seco.

Cuadro 2. Tratamientos de termoterapia usados en bulbillos de ajo morado (*A. sativum*) infectados con *S. cepivorum* para observar efecto sobre el desarrollo del patógeno. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

Table 2. Thermotherapy treatments used on purple garlic (*A. sativum*) bulbs infected with *S. cepivorum* to observe effect on the development of the pathogen. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

Tratamiento	Método	Temperatura (°C)	Tiempo
T1	Calor seco	35	12 h
T2	Calor seco	35	129,6 h
T3	Calor seco	50	48 min
T4	Calor seco	5	20 días
T5*	Calor seco	38	1 h
T6	Desinfección química	20 ±2	12 h
T7	Control ambiente	20 ±2	20 días
T8	Control absoluto	20 ±2	20 días

*Se eliminaron los tratamientos de termoterapia por inmersión en agua caliente, pero se conserva una de las temperaturas y tiempos consideradas en esa técnica para ser aplicado como calor seco. / * Heat water thermotherapy treatments have been eliminated, but one of the temperatures and times considered in that technique is preserved to be applied as dry heat.

Evaluación de S. cepivorum sobre bulbillos de ajo termotrados

Los bulbillos de ajo morado inoculados y termotrados, se colocaron en PDA y se incubaron a 18 °C hasta observar signos y síntomas de la enfermedad (micelio blanco sobre los bulbillos de ajo y formación de esclerocios), con el fin de determinar el efecto del tratamiento sobre el desarrollo de *S. cepivorum*. El ensayo se realizó en condiciones de laboratorio, bajo un diseño completamente al azar, donde la unidad experimental consistió en tres bulbillos de ajo con tres repeticiones por tratamiento y tres repeticiones en el tiempo.

Análisis de datos

Para el análisis de los datos se probaron los supuestos de normalidad, independencia de los errores y homogeneidad de varianza, mediante la prueba de Shapiro-wilk, Levene y Durbin Watson. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y modelos lineales generales y mixtos, donde la parte fija del modelo correspondió al tratamiento y la parte aleatoria a las repeticiones (Di-Rienzo & Casanoves, 2012). Para todas las variables se usó la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0,05$). Los datos se analizaron con el software estadístico R, versión 3.6.0.

Resultados

Evaluación de la aplicación de termoterapia a la semilla asexual de ajo sobre el desarrollo de las plantas

Evaluación del índice visual de dormancia (IVD)

El índice visual de dormancia (IVD) inicial promedio de los bulbillos fue de 20 %. Tras la aplicación de termoterapia por calor seco a 5 °C por 20 días, los bulbillos mostraron un IVD cercano al 80 % (Figura 2).

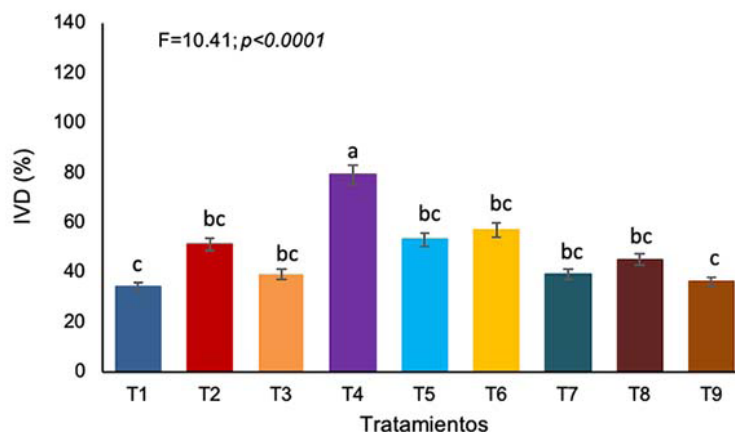


Figura 2. Índice visual de dormancia (IVD) de los bulbillos de ajo morado (*A. sativum*) sometidos a termoterapia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

T1 – T4 termoterapia por calor seco, T5 – T7 termoterapia por inmersión en agua caliente. T8 y T9 controles. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 días⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: desinfección química 12 h y T9: 20 °C 20 días. Letras diferentes indican diferencias significativas en p<0,05. Las barras indican el error estándar (EE).

Figure 2. Visual dormancy index (IVD) of purple garlic (*A. sativum*) bulbs undergoing thermotherapy. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

T1 - T4 dry heat thermotherapy, T5 - T7 hot water immersion thermotherapy. T8 and T9 controls. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 days⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: Chemical disinfection 12 h and T9: 20 °C 20 days⁻¹. Different letters indicate significant differences at p<0.05. The bars indicate standard error (SE).

Brotación de bulbillos de ajo

Los porcentajes de brotación alcanzados en el ensayo (Figura 3), mostraron que los bulbillos sometidos a termoterapia por calor seco a 5 °C por 20 días alcanzaron el mayor porcentaje (80 %) a los 12 dds, lo cual fue consistente con los valores que mostró el IVD de este mismo tratamiento (80 %) (Figura 2). El resto de los tratamientos alcanzaron este porcentaje de brotación entre los los 22 y 32 dds; sin embargo, fue notable el retraso en esta variable sobre los bulbillos sometidos a termoterapia por inmersión en agua caliente en los tratamientos de 48 °C por 30 min dos veces al día durante dos días (T6) y los bulbillos sometidos a termoterapia por calor seco a 35 °C por 12 h (T1), que alcanzaron entre 40 y 57 % de brotación a los 22 dds.

Crecimiento de las plantas de ajo a partir de bulbillos termotrados

Según la prueba de comparación de medias de Fisher, el tratamiento 4, correspondiente a la aplicación de termoterapia con calor seco a 5 °C por 20 días, contó con un número de hojas mayor en el día 90 dds (Figura 4), comparado con los demás tratamientos. En los días posteriores esta variable se equilibró entre tratamientos.

De la misma manera, el almacenamiento de la semilla a 5 °C por 20 días favoreció el crecimiento de las plantas de ajo en términos de acumulación de biomasa, al alcanzar una masa seca del bulbo cercano al obtenido con el tratamiento absoluto, 5,27 y 6,04 g, respectivamente, a los 150 dds (Figura 5). Las plantas bajo tratamiento de semilla en hidroterapia mostraron un menor desarrollo durante la evaluación del ensayo.

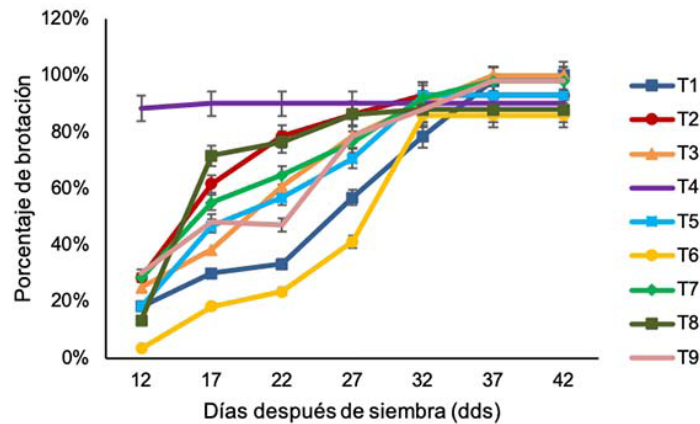


Figura 3. Porcentaje de brotación de los bulbillos de ajo morado (*A. sativum*) sometidos a los tratamientos de termoterapia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

T1 – T4 termoterapia por calor seco, T5 – T7 termoterapia por inmersión en agua caliente. T8 y T9 controles. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 días⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: desinfección química 12 h y T9: 20 °C 20 días. Las barras indican la desviación estándar (DS).

Figure 3. Sprouting percentage of purple garlic (*A. sativum*) bulblets subjected to thermotherapy treatments. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

T1 – T4 dry heat thermotherapy, T5 - T7 hot water immersion thermotherapy. T8 and T9 controls. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129.6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 days⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: Chemical disinfection 12 h and T9: 20 °C 20 days⁻¹. The bars indicate standard deviation (SD).

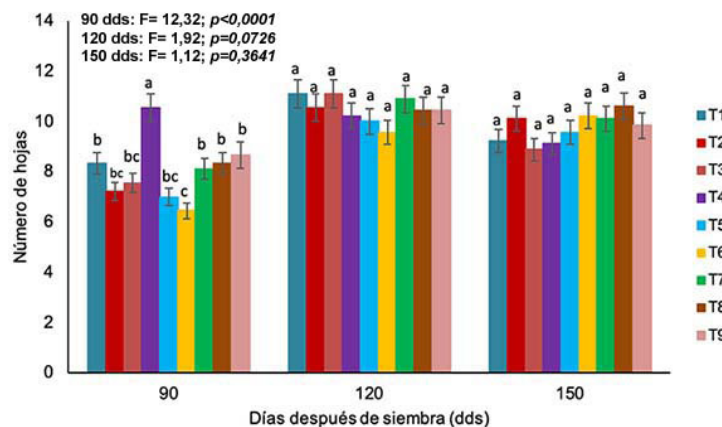


Figura 4. Número de hojas de las plantas de ajo morado (*A. sativum*), sometidas a los tratamientos de termoterapia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

T1 – T4 termoterapia por calor seco, T5 – T7 termoterapia por inmersión en agua caliente. T8 y T9 controles. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 días⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: desinfección química 12 h y T9: 20 °C 20 días. Letras diferentes indican diferencias significativas en p<0,05. Las barras indican el error estándar (EE).

Figure 4. Number of leaves of purple garlic (*A. sativum*) plants subjected to thermotherapy treatments. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

T1 – T4 dry heat thermotherapy, T5 - T7 hot water immersion thermotherapy. T8 and T9 controls. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129.6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 days⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: Chemical disinfection 12 h and T9: 20 °C 20 days⁻¹.

Different letters indicate significant differences at p <0.05. The bars indicate standard error (SE).

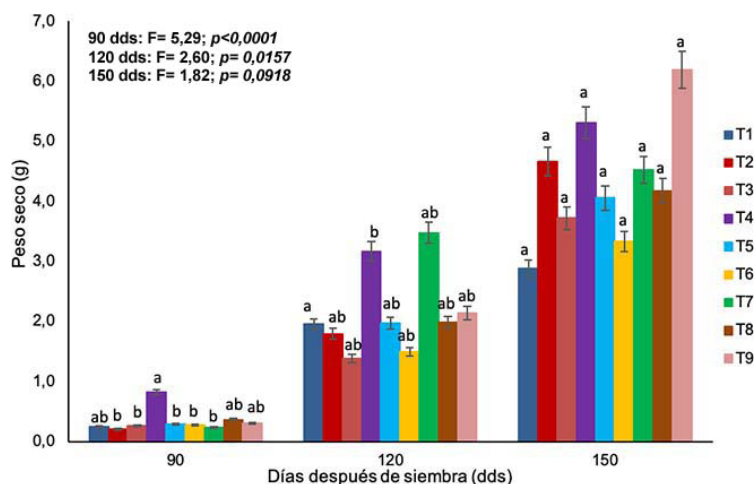


Figura 5. Masa seca de los bulbos de ajo morado (*A. sativum*) sometidos a los tratamientos de termoterapia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

T1 – T4 termoterapia por calor seco, T5 – T7 termoterapia por inmersión en agua caliente. T8 y T9 controles. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 días⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 × 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 × 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: desinfección química 12 h y T9: 20 °C 20 días. Letras diferentes indican diferencias significativas en p<0,05. Las barras indican el error estándar (EE).

Figure 5. Dry mass of purple garlic (*A. sativum*) bulbs subjected to thermotherapy treatments. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

T1 – T4 dry heat thermotherapy, T5 - T7 hot water immersion thermotherapy. T8 and T9 controls. T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129.6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 20 days⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹ (4 × 2), T6: 48 °C 30 min⁻¹ (4 × 2), T7: 50 °C 20 min⁻¹, T8: Chemical disinfection 12 h and T9: 20 °C 20 days⁻¹.

Different letters indicate significant differences at p<0.05. The bars indicate standard error (SE).

Evaluación de la aplicación de termoterapia para disminuir el inóculo de *S. cepivorum* en semilla asexual de ajo

Evaluación de S. cepivorum sobre bulbillos de ajo termotratarados

A partir de los 15 días después del termotratamiento (ddt), se observó crecimiento de micelio y desarrollo de esclerocios de *S. cepivorum* sobre los bulbillos de ajo en todos los tratamientos de los bulbillos inoculados con esclerocios (Figura 6), en el control absoluto (no inoculado) no se observó ningún crecimiento de patógenos.

Al momento de la evaluación final de la incidencia de la enfermedad (15 ddt), esta se presentó en un rango entre 33 y 100 % (Figura 7). La menor incidencia se obtuvo con el tratamiento T2: 35 °C 5 por cuatro días de termoterapia con 33 % de incidencia.

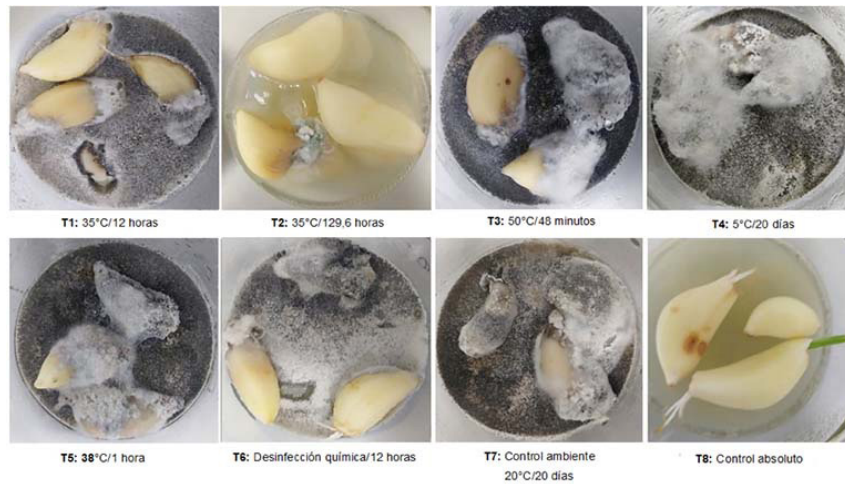


Figura 6. Crecimiento de *S. cepivorum* sobre bulbillos de ajo morado (*A. sativum*) inoculados 15 días después del termotratamiento (ddt). En el pie de cada foto se describen la temperatura y tiempo de cada tratamiento. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

Figure 6. Growth of *S. cepivorum* on inoculated purple garlic (*A. sativum*) bulbets 15 days after heat treatment (ddt). At the foot of each photo the temperature and time of each treatment are described. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

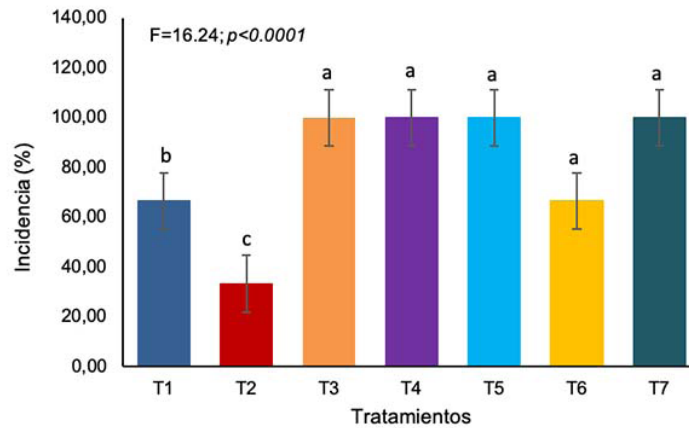


Figura 7. Incidencia de *S. cepivorum* en bulbillos de ajo morado (*A. sativum*) termotratados 15 días después del termotratamiento (15 ddt). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), Centro de Investigación Tibaitatá, Colombia, 2019.

T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 720 días⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹, T6: desinfección química 12 h⁻¹, T7: control ambiente 20 °C 20 días⁻¹ y T8: control absoluto (sin infección). Letras diferentes indican diferencias significativas en p<0,05. Las barras indican el error estándar (EE).

Figure 7. Incidence of *S. cepivorum* in heat-treated purple garlic (*A. sativum*) bulbets 15 days after heat treatment (ddt). Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (AGROSAVIA), Tibaitata Research Center, Colombia, 2019.

T1: 35 °C 12 h⁻¹, T2: 35 °C 129,6 h⁻¹, T3: 50 °C 48 min⁻¹, T4: 5 °C 720 days⁻¹, T5: 38 °C 1 h⁻¹, T6: Chemical disinfection 12 h⁻¹, T7: environmental control 20 °C 20 days⁻¹, and T8: absolute control (without infection). Different letters indicate significant differences at p<0.05. The bars indicate standard error (EE). p<0.05.

Discusión

El tratamiento de termoterapia por calor seco a baja temperatura (T4: 5 °C 20 días), favoreció la brotación de los bulbillos de ajo morado. Esta combinación de temperatura y tiempo permitió acelerar el evento de brotación de la semilla entre cinco y seis días con respecto al testigo (T9: 20 °C por 20 días). Estos resultados coinciden con los reportes hechos por Wu et al. (2016), quienes demostraron que la exposición de la semilla a temperaturas entre los 4 y 5 °C por periodos de tiempo prolongados (>30 días), favoreció significativamente la longitud de la hoja, disminuyó el período de crecimiento y promovió la producción de bulbillos por bulbo. El efecto observado del tratamiento de termoterapia por calor seco a baja temperatura no fue significativo en la reducción de los síntomas de *S. cepivorum*, pero este tratamiento puede ser usado para homogenizar la brotación de la semilla de ajo y lograr de esta manera un desarrollo más precoz del cultivo.

El retraso observado en la brotación de los bulbillos tratados con calor seco a temperaturas elevadas o inmersión en agua caliente, comparados con los bulbillos tratados con calor seco a baja temperatura, no significó una afectación a la viabilidad de la semilla, tal como lo reportó Varés-Megino et al. (2009), quienes indicaron que los tratamientos de termoterapia por inmersión en agua en rangos adecuados de temperatura (47-49 °C), no incidieron en forma negativa en la viabilidad de la semilla de ajo. Sin embargo, los tratamientos T6 (48 °C/30 min inmersión en agua) y T1 (35°C/12 h por calor seco), mostraron un retraso notable en la brotación de los bulbillos y esto afectó el desarrollo posterior de las plantas de ajo, las cuales alcanzaron su máxima masa seca del bulbo en un periodo más prolongado a los demás tratamientos.

Con base en la escala ecofisiológica propuesta por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Argentina [(1. Brotación, 2. Crecimiento vegetativo (6 a 7 hojas), 3. Rápido crecimiento vegetativo (10 a 11 hojas), 4. Crecimiento del bulbo y 5. Crecimiento final del bulbo (senescencia de las hojas)] (Atif et al., 2020; Burba, 2003), se observó que las plantas de ajo evaluadas se encontraban al final del ensayo en una etapa de rápido crecimiento vegetativo, con un desarrollo más precoz de las plantas en los tratamientos de termoterapia por calor seco a 5°C por 20 días (T4) y el control ambiente a 20±2 °C por 20 días (T9), los cuales mostraron una mayor acumulación de masa seca en el bulbo y la disminución en el número de hojas verdes en la planta a los 150 dds. Una vez inicia el desarrollo del bulbo se detiene la producción de hojas y estas entran en una etapa de senescencia (Atif et al., 2020; Escobar et al., 2012). El tratamiento a temperatura ambiente (T9) logró un mejor desarrollo de follaje en esta misma etapa, lo que se refleja en una mayor acumulación de biomasa en el bulbo (Kamenetsky, 2007). En este mismo sentido, el tratamiento de termoterapia por calor seco a 35 °C por 12 h (T1) y el tratamiento de termoterapia por inmersión en agua caliente a 48 °C por 30 min (T6) a los 150 dds, mostraron una acumulación de biomasa en el bulbo muy inferior a los demás tratamientos y un mayor número de hojas verdes con respecto al tratamiento T4. Estas diferencias visuales y numéricas pueden indicar que el periodo de desarrollo de las plantas de ajo de los tratamientos 1 y 6 fue más prolongado. Esto en campo significa mayor uso de recursos en la consecución de la producción de ajo.

Para la evaluación de termoterapia sobre la reducción del inóculo de *S. cepivorum* en bulbillos de ajo, se sometió la semilla de ajo infectada con el patógeno a los tratamientos de termoterapia por calor seco a 35 °C por 12 h (T2), 5 °C por 20 días (T4) y temperatura ambiente (T9: 20 °C por 20 días). Estos tratamientos mostraron los mejores resultados en cuanto a acumulación de biomasa en el bulbo y favorecieron la brotación de la semilla. Junto con estos tres tratamientos se evaluaron los tratamientos T1 (35 °C por 12 h), T3 (50 °C por 48 min) y T5 (38 °C por 1 h), los cuales mostraron una brotación y desarrollo de las plantas más lento.

Se observó una reducción en la incidencia de *S. cepivorum* sobre los bulbillos de ajo termotratados hasta un 33 % (Figura 7), con el tratamiento de termoterapia por calor seco a 35 °C por 129,6 h (T2). Al probar esta combinación de tiempo y temperatura sobre semilla asexual de ajo, se demostró la reducción en la incidencia de la enfermedad.

Conclusiones

Los tratamientos térmicos no afectaron la germinación, crecimiento y desarrollo de los bulbillos de ajo morado (*A. sativum*).

Las temperaturas bajas (menores a 5 °C) tuvieron un efecto sobre la dormancia de la semilla de ajo morado y aceleraron su proceso germinativo.

Durante el desarrollo del ensayo en condiciones de invernadero no se observaron síntomas de pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*).

Referencias

- Agrios, G. N. (2005). *Fitopatología* (2ª Ed.). Editorial Limusa.
- Atif, M. J., Amin, B., Ghani, M. I., Ali, M., & Cheng, Z. (2020). Variation in morphological and quality parameters in garlic (*Allium sativum* L.) bulb influenced by different photoperiod, temperature, sowing and harvesting time. *Plants*, 9(2), Article 155. <https://doi.org/10.3390/plants9020155>
- Burba, J. L. (2007). *Manejo de semilla de ajo frigoinducida*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Burba, J. L. (2003). *Producción de ajo*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Capuz-Bravo, N. J. (2013). *Control de pudrición blanca (Sclerotium cepivorum) en bulbillos de ajo (Allium sativum) variedad colorado para reproducción de plantas* [Tesis de Grado, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. Repositorio de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/558>
- Di-Rienzo, J. A. Di, & Casanoves, F. (2012). *Modelos lineales mixtos: aplicaciones en InfoStat* (1ª Ed.). Grupo Infostat.
- Escobar, H., Pinzón, H., & Parra, M. (2012). *Producción de semilla garantizada de ajo*. Ediciones Universidad Jorge Tadeo Lozano. <http://hdl.handle.net/20.500.12010/1881>
- Fayad-André, M. de S., Dusi, A. N., & Resende, R. O. (2011). Spread of viruses in garlic fields cultivated under different agricultural production systems in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 36(6), 341–349. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762011000600001>
- Granados, M. (2005). Pudrición blanca de la cebolla. *Agronomía Costarricense*, 29(2), 143–156.
- Kamenetsky, R. (2007). Garlic: Botany and horticulture. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (1ª Ed., Vol. 33, pp. 123–172). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470168011>
- McLean, K. L., Swaminathan, J., Frampton, C. M., Hunt, J. S., Ridgway, H. J., & Stewart, A. (2005). Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. *Plant Pathology*, 54(2), 212–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01158.x>
- McLean, K., Swaminathan, J., & Stewart, A. (2001). Increasing soil temperature to reduce viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00119-X](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00119-X)
- Mishra, R., Jaiswal, R. Kumar, D. Saabale, P., & Singh, A. (2014). Management of major diseases and insect pests of onion and garlic: A comprehensive review. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 6(11), 160–170. <https://doi.org/10.5897/JPBCS2014.0467>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). *Área, producción, rendimiento y participación mundial por cultivo*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Palmero, D. L., Patón, L. G., Díaz, M. G., Serna, J. G., & Sáez, S. B. (2013). The effects of storage duration, temperature and cultivar on the severity of garlic clove rot caused by *Fusarium proliferatum*. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.12.003>
- Prato-Sarmiento, A. I. (2016). Evaluación financiera de ajo (*Allium sativum* L.) morado Nacional y peruano en el altiplano cundiboyacense, Colombia. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 43–53. https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:460
- Red de Información y Comunicación del Sector Agropecuario Colombiano. (2020). *Área, producción, rendimiento y participación nacional por cultivo*. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
- Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Ulacio-Osorio, D., Zavaleta-Mejía, E., Martínez-Garza, A., & Pedroza-Sandoval, A. (2006). Strategies for management of *Sclerotium cepivorum* Berk. In garlic. *Journal of Plant Pathology*, 88(3), 253–261. <https://www.jstor.org/stable/41998329>
- Varés Megino, L., Correa Hernando, E., Iglesias González, C., & Palmero Llamas, D. (2009). Viabilidad de los ajos destinados a producción. *Agricultura*, 9(julio-agosto), 12–14.
- Velásquez-Valle, R., & Reveles-Hernández, M. (2016). Efecto de agentes de manejo alternativo sobre el desarrollo de pudrición blanca de ajo. *Revista Mexicana de Micología*, 44, 41–47. <https://doi.org/10.33885/sf.2016.3.1160>
- Wu, C., Wang, M., Cheng, Z., & Meng, H. (2016). Response of garlic (*Allium sativum* L.) bolting and bulbing to temperature and photoperiod treatments. *Biology Open*, 5(4), 507–518. <https://doi.org/10.1242/bio.016444>
- Zapata-Narváez, Y. A., Gómez-Marroquín, M. R., & Botina-Azain, B. L. (2020). Evaluation of microbial antagonists and essential oils in the control of *Sclerotium cepivorum* in garlic under controlled conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(2), 1–16. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-2>
- Zúñiga-Mendoza, E. (2013). *Efecto Antagonista de Tricoderma harzianum contra Sclerotium cepivorum y Sclerotium rolfsii agentes causales de la pudrición en cebolla* [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio del Instituto Politécnico Nacional. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/12791>