

# 1<sup>os</sup> Resultados de un programa de liberación de virus del Banco de Germoplasma de Ajo de Córdoba



Consejería de Agricultura y Pesca



**PRIMEROS RESULTADOS DE UN PROGRAMA  
DE LIBERACIÓN DE VIRUS DEL BANCO DE  
GERMOPLASMA DE AJO DE CÓRDOBA**



# **PRIMEROS RESULTADOS DE UN PROGRAMA DE LIBERACIÓN DE VIRUS DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE AJO DE CÓRDOBA**

(Proyecto de Investigación INIA, RF95-022 y GENRES-CT95-20)

\* Nieves Martín-Urdíroz,  
\* José Garrido,  
\* Xabier Barandiaran,  
\*\* Francisco Mansilla,  
\*\* M<sup>a</sup> Jesús Sánchez-Tapia,  
\*\* Jesús Martín.

\* Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba (UCO).  
Campus de Rabanales, edificio Severo Ochoa. 14071 Córdoba. Spain  
Tfno: 957 218 603 Fax: 957 218 650 e-mail: mi1masaj@uco.es

\*\* Instituto andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la  
Producción Ecológica. Centro de Investigación y Formación Agraria de Córdoba (CIFA).  
Alameda del Obispo s/n. Córdoba Tfno: 957 016 110

**PRIMEROS RESULTADOS DE UN PROGRAMA DE LIBERACIÓN DE VIRUS  
DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE AJO DE CÓRDOBA.**

© *Edita:* Junta de Andalucía. *Consejería de Agricultura y Pesca*

*Publica:* Viceconsejería. Servicios de Publicaciones y Divulgación

*Autores:* Varios

*Colección:* Agricultura

*Serie:* Sanidad Vegetal

*Depósito Legal:* SE-2.085-04

*I.S.B.N.:* 84-8474-129-X

*Fotocomposición e impresión:* J. de Haro Artes Gráficas, S.L. Parque Ind. P.I.S.A,  
Mairena del Aljarafe • Sevilla



## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCION</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>33</b>



## INTRODUCCIÓN

### Introducción general

El ajo se ha venido usando con fines medicinales desde la antigüedad, apareciendo la primera referencia escrita de este uso en un texto chino que data del año 510 a. C. Entre las diversas propiedades medicinales que se han adscrito al ajo se encuentran la prevención de enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis y las enfermedades coronarias (Milner, 2001; Amagase *et al.*, 2001; Reuter, 1995), la reducción de los niveles de colesterol sérico así como los niveles de triglicéridos (Myung *et al.*, 1982), también se ha asociado su consumo con una disminución en el riesgo de contraer cáncer (Dorant *et al.*, 1993; Agarwal, 1996). Este efecto terapéutico se atribuye a estructuras moleculares específicas que derivan fundamentalmente del alto contenido en compuestos azufrados (3 a 100 veces mayor contenido que en otras especies), responsables del aroma y sabor del ajo. Dos de estos compuestos, la alicina y el ajoeno, tienen una importancia demostrada en la prevención de la agregación plaquetaria (Block *et al.*, 1984; Bordia *et al.*, 1996). Asimismo, el ajo ha mostrado ser un potente agente antibiótico, antifúngico e insecticida (Huang *et al.*, 2000).

El ajo cultivado, *Allium sativum* L., es una planta de propagación vegetativa obligada mediante bulbos, debido a su incapacidad para producir flores fértiles y, por lo tanto, semilla de origen sexual. Este tipo de reproducción, por una parte, ha facilitado la transmisión y propagación de multitud de agentes infecciosos (nematodos, hongos y virus) que afectan considerablemente a la productividad del cultivo y, por otra, ha limitado la mejora genética del ajo, que se ha visto reducida así a la selección clonal.

En efecto, la dificultad de inducir la floración en esta especie hace imposible la aplicación de las técnicas de mejora genética clásica, basadas en cruzamientos y selecciones sucesivas de la descendencia y que son utilizadas en otras plantas hortícolas capaces de reproducirse sexualmente. Por ello, la mejora genética del ajo se ha visto restringida a la selección de la variabilidad preexistente, gran parte de la cual es conservada y caracterizada en diversos bancos de germoplasma, como, en el Centro de Investigación y Formación Agraria (Córdoba, España), Central Institute of Genetics and Crop Plant Research (Gatersleben, Alemania), Institute of Horticultural Research (Wellesbourne, UK), Centre for Genetic Resources (Wageningen, Holanda), etc... A pesar de la existencia de una variabilidad genética relativamente grande, la imposibilidad de

que exista un flujo génico entre los diversos cultivares impide que las características interesantes (rendimiento, resistencias, calidad...) puedan reunirse en una misma variedad.

### **Importancia económica de la especie**

El cultivo del ajo se encuentra ampliamente extendido en el mundo. Es, sin embargo, en Asia y Europa donde se concentra el mayor volumen de producción. El ajo es una planta muy apreciada tradicionalmente en los países asiáticos y latinos como condimento alimentario y por sus propiedades medicinales. En los últimos años también ha adquirido gran importancia en los países anglosajones, como en Estados Unidos donde se cultiva con gran éxito.

La producción de ajo de España, Francia e Italia constituye la mayor parte de la producción de la unión europea. Según el último anuario disponible (FAO 2003), en España se cultivaron unas 23.500 hectáreas de ajo, con una producción de 188.900 toneladas, por lo que el rendimiento medio fue aproximadamente de 8 t/ha de ajos frescos. Esto sitúa a nuestro país como séptimo productor mundial y primero europeo. En los últimos siete años, se ha observado un aumento considerable de la producción mientras que la superficie cultivada ha experimentado una disminución. Parte de este aumento en el rendimiento se debe al uso, cada vez más extendido, de "semilla" libre de virus obtenida mediante el cultivo *in vitro* de ápices.

### **Taxonomía, variabilidad y mejora genética de la especie**

El ajo, cuya denominación científica es *Allium sativum* L., es una planta vivaz y resistente al frío perteneciente a la familia *Alliaceae*, tribu *Alliie* (Hanelt, 1990). Esta familia está compuesta por plantas monocotiledóneas con flores que, por lo general, son llamativas y forman umbelas (Figura 1), en su mayor parte, son de porte herbáceo y con estructuras bulbosas. El género que tiene más interés agronómico dentro de esta familia es *Allium*, en el cual se incluyen más de 600 especies diferentes (Hanelt, 1990).

El origen del ajo cultivado es aún incierto, sin embargo, se considera como probable antecesor a la especie silvestre *Allium longicuspis* (Yamaguchi, 1983) ampliamente extendida por Asia Central (Vavilov, 1951). Aunque ya se ha dicho que el ajo cultivado no produce semilla de origen sexual, en los años 80 se recolectaron en las montañas de Tien Shan, en Kirguistán y en el Oeste de China



**FIGURA 1.** Inflorescencia en umbela de *Allium ampeloprasum*.

algunos clones fértiles que producían semillas (Etoh, 1986), en la misma región donde crece *Allium longicuspis*.

A pesar de las restricciones que presenta *Allium sativum* en cuanto a la recombinación genética, muestra una considerable variabilidad con respecto a sus características morfológicas (tamaño y número de dientes, peso del bulbo, etc.) y fisiológicas (temperatura y fotoperíodo necesarios para el crecimiento y la formación del bulbo), lo que refleja una base genética relativamente amplia.

En el Banco de Germoplasma de Ajo situado en el Centro de Investigación y Formación Agraria (C.I.F.A.) de Córdoba se conservan más de 400 entradas que representan una gran parte de la variabilidad genética existente a nivel mundial (Figura 2).



**FIGURA 2.** Plantas pertenecientes a distintas entradas del Banco de Germoplasma de Ajo situado en el C.I.F.A. de Córdoba (responsable: F. Mansilla).

En este cultivo, la variedad genética disponible es un recurso importante para los programas de mejora genética basados en la selección clonal.

Las poblaciones de ajo cultivadas tradicionalmente no son forzosamente homogéneas y es frecuente que el agricultor realice una selección de la "semilla" previa a la plantación. Esta selección se basa exclusivamente en la eliminación de los bulbos pequeños o mal conformados (selección masal). Este sistema es muy poco efectivo ya que la influencia ambiental es muy alta, lo que limita enormemente la ganancia genética.

En Francia, en los años 60 se inició un programa de selección masal de la población "Violet de Cadours" que produjo resultados muy limitados. Posteriormente, se llevaron a cabo programas de mejora más serios basados en la selección clonal para el rendimiento que, posteriormente, fueron ampliándose a otros caracteres de interés como el aspecto exterior del bulbo, la regularidad de los dientes, la menor proporción de dientes dobles y el color (Messiaen *et al.*, 1993).

Los programas de selección clonal se han complementado con programas de mejora sanitaria basados en la eliminación de virus y, secundariamente, de otros agentes infecciosos (hongos, bacterias y nematodos) mediante el cultivo *in vitro* de ápices (Keller y Fritsch, 1997; Senula *et al.*, 2000; Martín-Urdiroz *et al.*, 2001). Esta técnica se utiliza comúnmente para la propagación clonal y eliminación de virus en diversas especies de *Allium*. La alta estabilidad genética lograda en el material micropropagado, permite que el cultivo *in vitro* pueda ser utilizado para la conservación de germoplasma (Novak, 1990). Los aumentos de rendimiento que se obtienen utilizando esta metodología superan en muchos casos el 50%, lo que ha propiciado que varias empresas privadas se estén dedicando a la producción y comercialización de "semilla" libre de virus (semilla certificada).

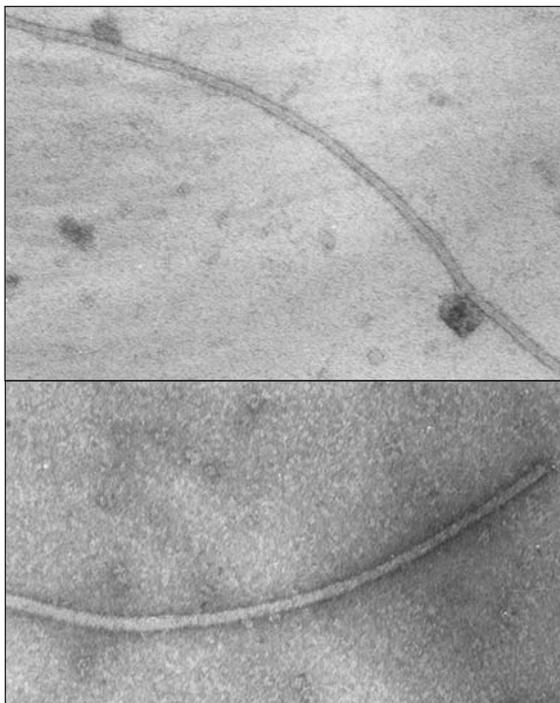
Sin embargo, a pesar de que, como ya hemos comentado, las especiales características reproductivas del ajo lo hacen inaccesible a las técnicas de mejora clásica, se han conseguido algunos éxitos, aún limitados, en la producción de semilla verdadera tanto en Japón (Etoh, 1983, 1985; Etoh *et al.*, 1988) como en Alemania (Konvicka, 1984) y en Estados Unidos (Pooler y Simon, 1993 y 1994). El eventual establecimiento de un sistema efectivo de reproducción sexual en ajo permitiría tener acceso a la variación genética generada por la meiosis y la fertilización. Por otra parte, la propagación de ajo por semilla resultaría un método más económico para la eliminación de virus y otros agentes infecciosos que la costosa propagación *in vitro* realizada actualmente, debido a que los virus y nematodos que infectan al ajo no suelen transmitirse por la semilla.

### **Virosis en *Allium sativum***

El tipo de propagación (vegetativa) al que se ve sometido el ajo ha facilitado la transmisión y acumulación de complejos de virus causantes de síntomas que suelen acompañarse de una reducción significativa en la producción.

La enfermedad típica es causada por diversos complejos virales que generan el llamado "mosaico del ajo", caracterizado por manchas y estrías cloróticas en

las hojas, pero cuya manifestación varía con el genotipo, la edad o el complejo vírico concreto. Los principales virus que componen estos complejos son, por orden de importancia, los pertenecientes a los géneros, *Potyvirus*, fundamentalmente *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV) (Figura 3), *Leek Yellow Stripe Virus* (LYSV) y *Shallot Yellow Stripe Virus* (SYSV), *Carlavirus* (Figura 4): *Garlic Common Latent Virus* (GCLV) y *Shallot Latent Virus* (SLV) (Van Dijk, 1993b; Bos *et al.*, 1978), y *Allexivirus*, así como de otros de menor incidencia pertenecientes al género *Reovirus* y familia *Partitiviridae* (Diekman, 1997).



**FIGURAS 3 y 4.** Micrografía electrónica de un *Potyvirus* (OYDV) (3) y un *Carlavirus* (4) extraído de plantas de ajo.

Los *Potyvirus* se encuentran extendidos por todo el mundo (Van Dijk, 1993a; Dovas *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Tienen por vectores a los áfidos, que los transmiten de forma no persistente. Se han estudiado los efectos de la infección por OYDV y LYSV sobre la producción de diferentes cultivares de ajo describiendo una reducción del peso del bulbo en rangos del 39 al 60% y del 17 al 54%, respectivamente. Además, se ha demostrado que la infección simultánea con ambos virus causa una mayor reducción del crecimiento y peso del bulbo cuantificándose ésta en un rango del 56 al 84%, dependiendo del cultivar, y aumentando hasta un 91% si se mantiene dicha coinfección durante varios años (Lot *et al.*, 1998).

Por otra parte, también están muy extendidos en el ajo dos *Carlavirus* (GCLV y SLV) (Figura 4), cuyas distribuciones geográficas son distintas: el GCLV se ha encontrado en la mayoría de los países, aunque no en cultivares tradicionales de Japón, Taiwán y Tailandia (Barg *et al.*, 1994, 1997) mientras que el SLV se ha

detectado, predominantemente, en Asia y Europa (Van Dijk, 1993b; Barg *et al.*, 1994, 1997). Estos virus se transmiten, igual que los *Potyvirus*, por áfidos y de forma no persistente (Van Dijk, 1993b; Barg *et al.*, 1994, 1997), aunque esta transmisión es menos eficiente que la de los *Potyvirus* (Bos, 1992; Van Dijk, 1993b). Hasta la fecha, no hay datos disponibles sobre el efecto que estos virus tienen en la sintomatología o en la reducción de la producción de los distintos cultivares de ajo. Aunque, podría ocurrir, como se ha descrito en puerro (Paludan, 1980), que la coinfección con SLV y LYSV incremente la pérdida de productividad.



**FIGURA 5.** Micrografía electrónica de Alexivirus aislados de plantas de ajo.

Otro grupo de virus que infectan al ajo son los recientemente denominados *Allexivirus* (Pringle, 1999) (Figura 5) en el que se incluyen el *Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C), *Garlic virus D* (GarV-D) (Sumi *et al.*, 1993), *Garlic virus E* (GarV-E) (Chen *et al.*, 2001), *Shallot Virus X* (Kanyuka *et al.*, 1992) y *Garlic virus X*

(GarV-X) (Song *et al.*, 1998). Estos virus no causan una sintomatología característica; pueden formar mosaicos leves, estrías amarillas cortas o incluso no dar síntomas y son transmitidos por el ácaro *Aceria tulipae* (Van Dijk, 1991), frecuente en los almacenes de ajo. Aún, se desconoce la posible repercusión que puedan tener estos virus sobre la producción.

Debido a las repercusiones económicas que han tenido las virosis en la producción de ajo, ha sido necesario liberar de virus a la "semilla" mediante el cultivo *in vitro* de ápices y, posteriormente, desarrollar un método eficaz y simple de diagnóstico para comprobar la presencia de los distintos virus de las plantas producidas. Los métodos de diagnóstico más comúnmente utilizados hasta la fecha están basados en las propiedades antigénicas de las cápsidas virales, lo que ha impuesto la necesidad de desarrollar sueros, monoclonales o policlonales, capaces de reconocer específicamente a cada virus o cepa viral, objetivo que no siempre es posible alcanzar. Las técnicas serológicas más utilizadas para la indexación viral son: ELISA, en sus variantes Double Antibody Sandwich (DAS-ELISA) (Clark *et al.*, 1977), Triple Antibody Sandwich (TAS-ELISA) (Vetten *et al.*,

1992) y Plate Trapped Antigen o Antigen Coated Plated (PTA/ACP-ELISA) (Vetten *et al.*, 1992) e inmunoadsorción-microscopía electrónica (ISEM). Más recientemente, se vienen implementando las técnicas moleculares al uso: Transcriptasa Inversa-PCR (RT-PCR) e Inmuncaptura (IC)-RT-PCR. Dovas y colaboradores (2001) han comparado los métodos más empleados en la detección de virus en *Allium*: ELISA, RT-PCR e IC-RT-PCR y han concluido que las técnicas moleculares son de 102 a 104 veces más sensibles que la técnica de ELISA, aparte de que, la fiabilidad de la técnica ELISA depende enormemente de la existencia frecuente de variantes antigénicas así como de la concentración de virus en las hojas infectadas que, a su vez, varía en el tiempo y en función del órgano y región del mismo (Dovas *et al.*, 2001). Sin embargo, el diagnóstico mediante técnicas moleculares es más costoso y menos práctico llevado a gran escala que los basados en técnicas serológicas.

### **Cultivo *in vitro* de *Allium sativum***

El cultivo de ápices se ha utilizado frecuentemente en *Allium sativum* para la eliminación de virus y la propagación rápida del material saneado. Esta técnica resulta especialmente útil en una planta como el ajo, que, por ser de reproducción vegetativa obligada, se ve afectada de manera importante por numerosos virus. En el proceso de liberación de virus en ajo algunos autores (Conci y Nome, 1991; Peiwen *et al.*, 1994) han combinado el cultivo de ápices con el uso de la termoterapia. El empleo de ésta parece que incrementa notablemente el porcentaje de plantas libres de virus aunque disminuye la supervivencia de las yemas (Conci y Nome, 1991).

Los principales factores a considerar en un programa de multiplicación *in vitro* de ajo son: la tasa de multiplicación y el grado y calidad de la bulbificación. La tasa de multiplicación es el número de propágulos que se producen por propágulo inicial en un tiempo definido, que limitará la velocidad con la que podremos multiplicar un determinado material o, lo que es lo mismo, la cantidad de plantas que podremos obtener en cada ciclo de cultivo. Por otra parte, la microbulbificación o bulbificación *in vitro* determinará la facilidad de aclimatación del material y, por tanto, su tasa de supervivencia *extra vitrum*. Asimismo, el tamaño de los microbulbos puede condicionar el período de tiempo necesario para obtener "semilla" comercial.

Los trabajos más destacados realizados hasta la fecha en micropropagación de *Allium sativum* se iniciaron a principios de los años 60 por el INRA francés

(Messiaen y Marrou, 1965), que en 1972 ya fue capaz de producir 197 toneladas de "semilla" certificada (Messiaen *et al.*, 1993). En España las primeras investigaciones en este campo se iniciaron a finales de los años 70 con los trabajos de Ayuso y Peña-Iglesias (1981).

El proceso de micropropagación se inicia estableciendo en cultivo una yema que, en la gran mayoría de los trabajos publicados corresponde a la yema apical presente en el disco basal del brote interior de los bulbos maduros (Bhojwani, 1980; Peña-Iglesias *et al.*, 1982; Conci y Nome, 1991; Ravnikar *et al.*, 1993; Nagakubo *et al.*, 1993; Mohamed-Yassen *et al.*, 1994). Ocasionalmente, se han utilizado otro tipo de yemas, como las que se encuentran en los bulbos inmaduros (Barandiaran *et al.*, 1999).

Las condiciones físicas utilizadas de forma rutinaria en la micropropagación del ajo incluyen: temperaturas alrededor de los 25°C, fotoperíodos de 16/8 e intensidades lumínicas cercanas a los 1500 lux (Bhojwani, 1980; Peña-Iglesias y Ayuso, 1982; Moriconi *et al.*, 1990; Barandiaran *et al.*, 1999; Senula *et al.*, 2000).

La bulbificación de ajo *in vitro* ha sido estudiada por varios autores con el fin de obtener una cantidad y calidad aceptable de microbulbos. Las estrategias empleadas han sido el cambio de las condiciones físicas del cultivo (luz y temperatura) (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994; Nagakubo *et al.*, 1993), el cambio en la concentración y tipo de la fuente de carbono utilizada (Seabrook, 1993) y la utilización de compuestos químicos específicos (Ravnikar *et al.*, 1993). Finalmente, nuestro grupo (Barandiaran *et al.*, 1999) obtuvo mediante el cultivo en un único medio durante un período de tiempo largo (más de 16 semanas) un 100% de bulbificación con unos diámetros que variaron entre 2.7 y 5 mm



**FIGURA 6.** Diferencias, según los genotipos, en el tamaño de los bulbillos formados *in vitro*.

dependiendo del genotipo (Figura 6).

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos de la evaluación del proceso de liberación de virus de 57 entradas pertenecientes al Banco de Germoplasma del C.I.F.A. de Córdoba.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron bulbos inmaduros procedentes de plantas correspondientes a 57 entradas proporcionadas por el Banco de Germoplasma de Ajo situado en el Centro de Investigación y Formación Agraria (C.I.F.A.) de Córdoba. En la Tabla 1 se indica el nombre de las entradas empleadas junto con sus códigos correspondientes a la "Allium European Database (AEDB)" y el nombre del grupo general al que pertenecen.

**TABLA 1.** Entradas procedentes del Banco de Germoplasma (C.I.F.A.) de Córdoba establecidas *in vitro*. Se indica el código correspondiente a la "Allium European Database (AEDB)" de cada entrada y el tipo genérico al que pertenecen.

ENTRADA	Nº AEDB	TIPO
Rojo Rute	E213085	Morado
Cardenal LIV	V214162	Morado
In Vitro	E213090	Morado
J. García	E213123	Morado
Morado Pedroñeras	E213002	Morado
Rojo La Carlota	E213110	Morado
Rojo Infantas	E213111	Morado
Marzo	E213088	Morado
956/86 J	E213029	Morado
Cabra Monturque	E213138	Morado
Morado Cuenca	E213072	Morado
Arica	E551115	Morado
Bañolas I	E213043	Morado
Ancud	E252144	Morado
485/87	E213019	Morado

ENTRADA	Nº AEDB	TIPO
J. Moncayo B.	E213160	Morado
A. Álvarez	E213152	Morado
106/87	E213005	Morado
A. Campo	E213157	Morado
C. del Obispo	E213001	Morado
117/86	E213033	Morado
Taiwán	E432014	Chino
Indio	E432082	Chino
Chino Blanco	E432079	Chino
Chino Rojo	E432044	Chino
T-530	V422012	Chino
Colorados	E432329	Chino
Chino CIDACO	E432095	Chino
Aja Fuente Palmera	E715146	Aja
1054/86	E112023	Blanco
Blanco Vallelado	E112054	Blanco
882/86	E112028	Blanco
Huelma 4	E112102	Blanco
Aja Rondeña	E112081	Blanco
Huelma 3	E112101	Blanco
1035	E112035	Blanco
Blanco Valladolid	E112052	Blanco
Basic I (M.J.)	V123215	Blanco
Lorenzo	E112137	Blanco
Saturnino	E112073	Blanco
Zahorsky	E222011	Blanco

<b>ENTRADA</b>	<b>Nº AEDB</b>	<b>TIPO</b>
Huelma J	E113112	Blanco
Marruecos	E143047	Blanco
135	E112024	Blanco
Ahorcado	E112130	Blanco
743/86	E112025	Blanco
Hinojosa	E112134	Blanco
Arzua	E113142	Blanco
R. Gil	E112155	Blanco
Blanco Ronda	E112051	Blanco
T-240	V321010	Blanco
Mallorquín	E111300	Blanco
Printanor	V324009	Rosa
Chinchón	E315048	Rosa
Brasileño	E551103	Brasileño
Centenario	E551104	Brasileño
Chinés	E551100	Brasileño

### **Cultivo *in vitro***

Los bulbos inmaduros recogidos 2 meses antes de la fecha normal de su cosecha, previamente lavados con agua jabonosa y sumergidos en etanol de 96°, se esterilizaron superficialmente mediante inmersión durante 20 minutos en una solución de hipoclorito sódico (1% de cloro activo), enjuagándolos posteriormente en agua bidestilada estéril (3 veces durante 5 minutos cada vez).

Por cada entrada se extrajeron en condiciones asépticas y con la ayuda de un microscopio binocular 50 yemas axilares de 0.5 mm aproximadamente. Las yemas axilares se cultivaron en tubos de 10 ml conteniendo 5 ml de medio de cultivo descrito por Barandiaran y colaboradores (1999). Éste se preparó disolviendo las sales B5 (Gamborg *et al.*, 1968), los reguladores de crecimiento ANA y 2iP en concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/l, respectivamente, y 30 g/l de sacarosa en un 90% del volumen final de agua bidestilada. Posteriormente, se ajustó



tó el pH de los medios a 5.7 con una solución 1N de NaOH y se completó con agua bidestilada hasta el volumen final. Finalmente, se añadió al medio de cultivo 9 g/l de Bactoagar (DIFCO) y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

El material vegetal se cultivó en una cámara de cultivo a una temperatura controlada de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperíodo de 16/8 horas con una intensidad lumínica de 1500 lux suministrado por lámparas fluorescentes Sylvania GroLux.

Seis semanas después del establecimiento *in vitro* de las yemas axilares, las plántulas obtenidas se transfirieron a frascos Magenta de 175 ml (SIGMA) conteniendo 50 ml del mismo medio. En esta etapa se inició la multiplicación, enraizamiento y bulbificación de las plantas.

### **Cultivo *extra vitrum***

El programa de saneamiento de las distintas entradas se llevó a cabo de manera continua desde 1996 a 1999. Las entradas se agruparon en 3 grupos diferentes (I, II y III, respectivamente) de acuerdo con el año en el que se establecieron *in vitro* (1996, 1997 y 1998). Las entradas del grupo I fueron transferidas a macetas en marzo de 1997, mientras que las del grupo II y III fueron transferidas en noviembre-diciembre de 1997 y 1998, respectivamente.

Las plantas bulbificadas *in vitro* se sometieron a un tratamiento de frío (4-8°C) durante 20 días antes de su establecimiento en tierra. Posteriormente, las plántulas se extrajeron del medio eliminándose los brotes y las raíces. Para prevenir infecciones posteriores, los bulbos se lavaron con abundante agua eliminando los restos de agar. Seguidamente, se sembraron los bulbos en macetas de 20 cm conteniendo una mezcla de turba, arena y limo (2:1:1) tratada con 8 gr/l de fungicida ((N-tiotriclorometil) 4 ciclohexeno 1,2 dicarboximida al 50%) e insecticida (Etilclorpirifos al 0.15%). Este sustrato se fertilizó, además, con nitrosulfato amónico al 26%. Todo el material vegetal sembrado se mantuvo bajo malla anti-áfidos que se localizó en Córdoba. Esta región se caracteriza por poseer un clima continental con temperaturas muy altas en verano y relativamente suaves en invierno. La media de lluvias caídas al año es de 600 mm.

El año 1997 fue especialmente lluvioso (1034 mm) mientras que los siguientes años fueron mucho más secos: 410 mm en 1998 y 468 mm en 1999. En estos tres años la temperatura máxima media estuvo alrededor de 25°C y la temperatura mínima media alrededor de 11.5°C. Sin embargo, la última temporada (98/99) presentó un invierno especialmente frío con unas temperaturas mínimas medias en diciembre, enero y febrero de 1.4, 2.3 y 1.6°C, respectivamente.

Los bulbos se cosecharon en mayo o junio, dependiendo de las distintas entradas, y se almacenaron individualmente en bolsas de malla marcadas convenientemente. Todo el material cosechado se mantuvo con estrictas condiciones fitosanitarias y, además, se trató cada diez días con azufre, actuando éste como insecticida y fungicida.

Con el objetivo de evaluar la eficacia de la transferencia a tierra de las plántulas, se midieron las tasas de multiplicación (bulbos cosechados por bulbo plantado) y los pesos de las cabezas o bulbos cosechados.

### **Análisis de virus**

Los bulbos se cultivaron en macetas durante 2 ciclos hasta que las plantas se desarrollaron suficientemente para obtener material y para alcanzar una concentración de virus detectable y poder así realizar los análisis de posible presencia (Ghosh *et al.*, 1997) por las técnicas utilizadas.

Los análisis de las plantas aclimatadas se realizaron mediante las tres variantes de la técnica ELISA, DAS-ELISA (Clark *et al.*, 1977), TAS-ELISA (Vetten *et al.*, 1992) y PTA/ACP-ELISA (Vetten *et al.*, 1992). Para ello, se utilizaron anticuerpos policlonales y monoclonales generados frente a aislados de los distintos virus, que fueron desarrollados por el Instituto de Bioquímica y Virología Vegetal (BBA, Braunschweig) (Barg *et al.*, 1994; Barg, 1996) y nos fueron cedidos gentilmente por los Dres. Lesemann y Vetten pertenecientes al mismo instituto (Tabla 2). Se analizó la presencia en las plantas de *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV), *Leek Yellow Stripe Virus* (LYSV), virus inespecíficos del género *Potyvirus*, *Garlic Common Latent Virus* (GCLV), *Shallot Latent Virus* (SLV) y un complejo de diversos *Allexivirus*.

El material vegetal utilizado fue la tercera hoja de plantas aclimatadas y crecidas durante dos ciclos en maceta. Las muestras se homogeneizaron y diluyeron en tampón fosfato adicionado con 0.05% de Tween 20 y 2% de PVP 40 con una relación 1:20 (0.1 g de hoja fresca en 2 ml de tampón) en DAS- y TAS-ELISA y en tampón carbonato pH 9.6 con una relación 1:100 (0.002 g de hoja fresca en 2 ml) en PTA/ACP-ELISA. Como controles positivos y negativos se usaron porciones de hojas procedentes de plantas indicadoras infectadas o no con cada virus de ajo, que fueron suministradas gentilmente por los Dres. Lesemann y Vetten (BBA). Por cada clon de plantas se realizaron tres análisis, a los 3, 6 y 7 meses después de la siembra de los bulbos.

**TABLA 2.** Virus que reconocen los sueros utilizados en el análisis mediante las distintas variantes de ELISA de las plantas saneadas por cultivo *in vitro*.

Tipo Anticuerpo	Nombre	Virus Reconocido	Tipo ELISA
Policlonal	LYSV 1083	LYSV	DAS-
	GVD-Walkey, 1301	GV-D	DAS-
	Allexivirus 477	MbFv	DAS-
	GCLV 892	GCLV	DAS-
	OYDV 935	OYDV	TAS-
	SLV 991	SLV	TAS-
	SLV 944	SLV	TAS-
Monoclonal	2G3	SLV	TAS-
	5B5	SLV	TAS-
	6A9	SLV	TAS-
	5G1	OYDV	TAS-
	3H8	Potyvirus	PTA-

En los casos en los que las plantas analizadas dieron resultados negativos o dudosos para la presencia de virus mediante ELISA, las muestras se observaron al microscopio electrónico (Philips CM-10) mediante la técnica de ISEM (“InmunoSorbent Electrón Microscopy”). Este método consiste en capturar con anticuerpos los virus que estén presentes en la muestra, de forma que se aumenta la probabilidad de observar en el microscopio alguna partícula viral si la carga viral de la muestra es baja.

La preparación de las muestras se llevó a cabo en rejillas de níquel (con tamaño de cuadrícula de 300 µm), las cuales se incubaron, en primer lugar, en tampón fosfato durante 5 minutos en una solución 1:1000 de un anticuerpo policlonal (Pab-D) producido en el Departamento de Microbiología de la UCO frente a una mezcla viral obtenida de una mezcla de hojas virosadas de varios cultivos que reconocen a virus pertenecientes a los grupos *Potyvirus*, *Carlavirus* y *Allexivirus*. Transcurrido este tiempo las rejillas se lavaron con tampón fosfato, se secaron y se incubaron en un extracto de hoja durante 12 horas en atmósfera húmeda y a temperatura ambiente. Este extracto se obtuvo homogenei-

zando 0.1 g de hoja con 2 ml de una solución de tampón fosfato conteniendo 2% de PVP 40 y 0.2% de sulfito sódico. Finalmente, las rejillas se lavaron con agua desionizada y se tiñeron con 10 gotas de acetato de uranilo al 1%. Todos los reactivos empleados se filtraron con membranas de 0.22 µm.

En resumen, el esquema seguido para completar el proceso de liberación de virus de las plantas de ajo de las distintas entradas se muestra en la Figura 7.

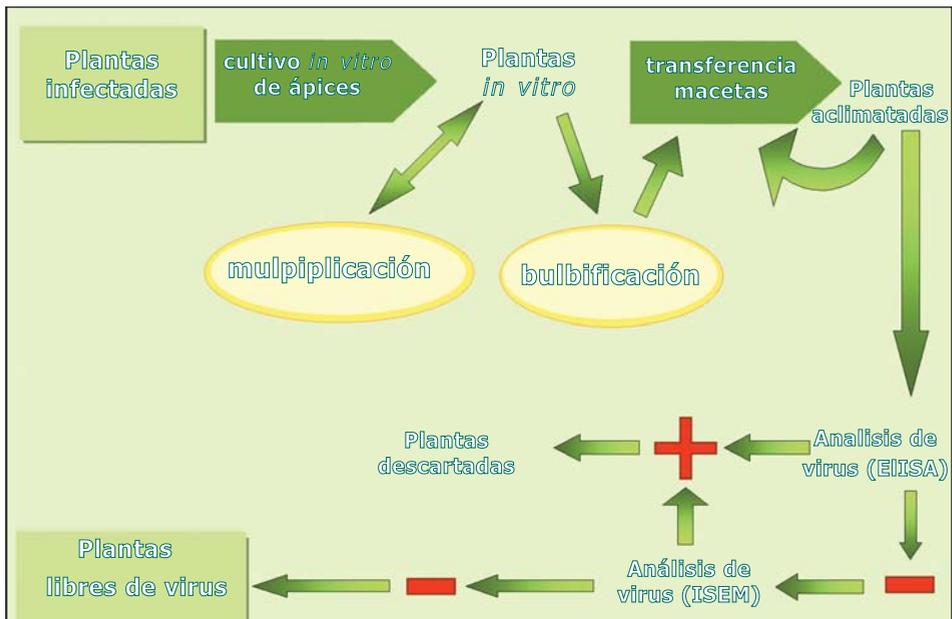


FIGURA 7. Esquema del procedimiento seguido para la obtención de plantas de ajo libres de virus.





## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Micropropagación y aclimatación de plantas libres de virus. Diagnóstico viral

A lo largo de 4 años, se han establecido *in vitro* 57 entradas pertenecientes al Banco de Germoplasma de Ajo del C.I.F.A. de Córdoba con un porcentaje de supervivencia de las yemas axilares de prácticamente el 100%. Por cada entrada se transfirieron a maceta 40 bulbos *in vitro*, que se cultivaron *extra vitrum* durante 2 ó 3 ciclos (según el año en el que cada entrada fue establecida *in vitro*). Los bulbos cosechados en cada temporada se evaluaron con relación a la tasa de multiplicación y al peso seco, excepto para algunos bulbos sembrados en marzo de 1997 en los que no se midió esta última variable.

En la transferencia a macetas, la tasa de supervivencia media (TSM) de los grupos de entradas I, II y III (Tabla 3) fue 8.7%, 12.6% y 17%, respectivamente. Por otro lado, el número de pérdidas de entradas en el proceso de aclimatación varió en los diferentes grupos. Mientras que en el grupo II todas las entradas produjeron alguna planta, los grupos I y III perdieron un 28% y 11.1% de las entradas. Sin embargo, en el segundo ciclo de cultivo del grupo I se perdieron un elevado número de entradas (66.7%). Dentro de cada grupo, cuando se compararon las tasas de supervivencia de las entradas, se observaron grandes diferencias. Algunas entradas se perdieron completamente mientras que otras presentaron una tasa de supervivencia del 35% (grupos I y III). En particular, algunas entradas como Blanco del Cerro (grupo II) presentaron una tasa de supervivencia especialmente alta (75%). Las diferencias mostradas entre los grupos se podrían explicar en función de las variaciones climáticas encontradas entre las diferentes temporadas (ver materiales y métodos), aunque las diferencias entre entradas pertenecientes a un mismo grupo parecen debidas a las diferencias genéticas que presentan para la habilidad de sobrevivir al proceso de aclimatación.

La producción de los diferentes grupos de entradas en el primer año de cultivo *extra vitrum* resultó distinta dependiendo de la temporada. En términos de tasa de multiplicación de los bulbos sembrados, el mejor primer período fue la temporada de diciembre de 1997 a junio de 1998. Ésta resultó ser la más seca, presentando una menor incidencia de enfermedades fúngicas y permitiendo un mayor control del riego. La tasa de multiplicación media de las entradas transferidas a maceta en este período (grupo II) fue 4.9 dientes por diente sembrado. Además esta temporada se mostró muy favorable para la tasa de multipli-

cación de las 6 entradas sembradas por segunda vez (13.8 dientes por diente sembrado de media). Sin embargo, en las otras temporadas, la tasa de multiplicación media de las plantas transferidas a maceta no sobrepasó la unidad. La entrada T-240 mostró la tasa más alta (10.1) cuando se consideró el primer período y únicamente aquellas entradas que experimentaron multiplicación, mientras que 1054/86 presentó la tasa más baja (1.9). Además, la entrada T-240 mostró la tasa de multiplicación más alta (28.9) en el segundo período de multiplicación en macetas seguida por Arzua (20) mientras que en Aja FP se encontró el resultado más bajo (1.2). Los resultados obtenidos con la entrada T-240 reflejaron que las diferencias genéticas entre las entradas tuvieron mayor influencia sobre las tasas de multiplicación que las diferencias de las condiciones climáticas.

De todas las entradas pertenecientes al grupo I, únicamente sobrevivieron 6 después de sembrarse el primer y segundo ciclo en macetas. Estas entradas fueron las únicas en sembrarse un tercer ciclo. En esa temporada la tasa de multiplicación media de todas las entradas fue 10.5. Esta tasa sufrió una reducción con respecto a la temporada anterior, excepto para las entradas Aja FP y R. Gil. La entrada R. Gil mostró el mejor resultado de las que se cultivaron un tercer ciclo (15.8) (Tabla 3). Esta reducción experimentada en las tasas de multiplicación podría ser explicada teniendo en cuenta las temperaturas anormalmente bajas recogidas en los tres primeros meses de esa temporada (ver materiales y métodos).

Otra variable importante es el tamaño de los bulbos producidos en cada uno de los ciclos de multiplicación, ya que puede determinar la calidad de las plantas desarrolladas y el tiempo requerido para la obtención de dientes de tamaño estándar.

La media de los pesos secos medios de los bulbos cosechados después del primer ciclo en macetas resultó ser 6 g. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas cuando se consideraron separadamente las cosechas de los grupos II y III. Los bulbos pertenecientes al grupo II obtuvieron una media de los pesos secos medios de 11.3 g, mientras que la de los producidos por el grupo III fue de 0.7 g. Las entradas que presentaron mejores resultados en ambas temporadas pertenecieron al tipo chino: Chino Rojo, sembrado en 1997, produjo bulbos con un peso seco medio de 16.8 g mientras que Chino Blanco, sembrado en 1998, los produjo con un peso seco medio de 2.3 g. Por otro lado, las entradas que mostraron la producción más baja en cada temporada fueron Bañolas I (3.7 g) y A. Alvarez (0.14 g). De nuevo, parece que las bajas temperaturas registradas en los primeros tres meses de la temporadas 98/99 tuvieron un efecto negativo sobre la productividad del ajo.

Por otra parte, cuando consideramos los bulbos sembrados en macetas por segunda vez, la media de los pesos secos medios experimentó un incremento significativo (15.8 g). En esta segunda cosecha, en algunas entradas únicamente sobrevivió un bulbo. Este es el caso de Hinojosa que produjo el bulbo con mayor peso seco, 43.4 g. Por el contrario, los bulbos pertenecientes a Arica mostraron el peso medio más bajo con 4.6 g (Tabla 3). Las entradas transferidas a macetas en diciembre de 1997 (grupo II) presentaron una variación media en el peso seco del 14.6% cuando se compara con la primera cosecha. Incluso, algunas entradas como 1054/86 llegaron a mostrar un incremento en la media de sus pesos secos del 157.9% mientras que otras como T-530 sufrieron una reducción de la misma variable (Tabla 3).

Las entradas pertenecientes al grupo I fueron las únicas en sembrarse un tercer ciclo de multiplicación en maceta. Los bulbos cosechados al final de este ciclo mostraron una reducción en su media de pesos secos del 33%. Considerando individualmente cada entrada, todas sufrieron una reducción excepto Aja FP. Esta entrada prácticamente dobló el peso medio recogido en la temporada anterior. Este tercer ciclo de multiplicación se llevó a cabo en el período 98/99 en el que se registraron las temperaturas más bajas.

En la última temporada, los bulbos cosechados se pesaron inmediatamente después de la cosecha (peso fresco) y, después del almacenamiento, 5 meses más tarde (peso seco), y se observó que el peso medio sufrió una reducción del 14.4%. Se encontraron diferencias en el porcentaje de reducción de las distintas entradas mientras que unas como 1054/86 redujeron su peso en un 1% otros como Huelma 3 sufrieron una reducción del 30%.

Debido a que el objetivo era producir plantas libres de virus fue necesario llevar a cabo análisis de su presencia en las plantas transferidas a maceta. Para ello, se empleó una batería amplia de anticuerpos que aseguró la detección de la mayoría de los virus que infectan al ajo. El material utilizado para los análisis fueron hojas de plantas suficientemente desarrolladas con el fin de evitar resultados erróneos en la detección de virus en bajas concentraciones (Ghosh *et al.*, 1997).

Se analizaron un total de 135 clones para detectar la presencia de virus con los anticuerpos descritos en el capítulo anterior. La inmensa mayoría de las entradas presentaron al menos un clon totalmente libre de virus. De todos los clones analizados resultaron libres de virus 88. Una vez analizados mediante la técnica ELISA, éstos se volvieron a examinar mediante la técnica de ISEM confirmando la negatividad presentada mediante ELISA. De los 47 clones infectados el 95,7% lo estaban de *Allxivirus*; el 8,5% de LYSV; el 6,4% de GCLV; el 4,3% de SLV y el 2,1% de OYDV.



**TABLA 3.** Datos de multiplicación y peso de los bulbos transferidos a tierra después de cosecharlos en cada ciclo de siembra.

ENTRADA	TIPO	1º CICLO SIEMBRA		2º CICLO SIEMBRA		3º CICLO SIEMBRA	
		Multipl.	Peso	Multipl.	Peso	Multipl.	Peso
GRUPO I (establecidas <i>in vitro</i> en 1996)	Rojo Rute	Morado	Perdido				
	Cardenal LIV	Morado	Perdido				
	In Vitro	Morado	Perdido				
	J. García	Morado	Perdido				
	Morado Pedroñeras	Morado	Perdido				
	Blanco Vallelado	Blanco	Perdido				
	Printanor	Rosa	Perdido				
	Taiwan	Chino	1	Perdido			
	Rojo La Carlota	Morado	1	Perdido			
	Rojo Infantas	Morado	1	Perdido			
	Marzo	Morado	1	Perdido			
	956/86 J	Morado	1	Perdido			
	Cabra Monturque	Morado	1	Perdido			
	Huelma 4	Blanco	1	Perdido			
	882/86	Blanco	1	Perdido			
	Marruecos	Blanco	1	Perdido			
	135	Blanco	1	Perdido			
	Ahorcado	Blanco	1	Perdido			
	743/86	Blanco	1	Perdido			
	Hinojosa	Blanco	1	17	43,4	10,4±3,1	13,3 ± 4,5
	Arzua	Blanco	1	20	27,8	15,3±4,5	16,7 ± 5,7
	R. Gil	Blanco	1	13,3±8,4	26,3 ± 12,6	15,8±3,4	24,2 ± 7
	Morado Cuenca	Morado	1	12	26,5	8,4±2,8	7,9 ± 2,3
	Chinés	Brasileño	1	19,3±10,3	30 ± 14,7	8,4±2,9	13,9 ± 3,6
	Aja Fuente Palmera	Aja	1	1,2±0,5	7,7 ± 9	4,5±4,5	11 ± 12,2

**Primeros resultados de un programa de liberación  
de virus del Banco de Germoplasma de Ajo de Córdoba**

	ENTRADA	TIPO	1º CICLO SIEMBRA		2º CICLO SIEMBRA	
			Multiplicac.	Peso	Multiplicac.	Peso
GRUPO II (establecidas in vitro en 1997)	Blanco Ronda	Blanco	3.8±2.9	10,1 ± 8,3	5±2.1	16,2 ± 8,9
	T-240	Blanco	10.1±7.7	12,5 ± 6,7	28.9±8.4	10,4 ± 3,4
	1054/86	Blanco	1.9±1.8	3,8 ± 3,1	6.3±4.2	9,8 ± 3,5
	Aja Rondeña	Blanco	4.1±2.7	9,8 ± 7,9	9.9±4.3	16,1 ± 9,9
	Huelma 3	Blanco	4.6±3.5	10,4 ± 7,8	7.4±4.8	12,8 ± 7,7
	Centenario	Brasileño	2.7±2	16,3 ± 2,7	12.5±1.3	11,6 ± 8,3
	Chino Rojo	Chino	4.9±3.9	16,8 ± 12,4	10.9±4.6	16,1 ± 6
	Indio	Chino	4.7±4.5	14,6 ± 10,3	9.7±5.8	14,7 ± 8,2
	T-530	Chino	5.3±4	16,2 ± 7,9	5.6±2.6	9,3 ± 4,6
	Bañolas I	Morado	3.8±1.7	3,7 ± 0,8	6.7±3.6	5,6 ± 3,1
	J. Moncayo B.	Morado	3.8±2.4	14,1 ± 6,5	7.1±3.9	13,2 ± 6
	Ancud	Morado	7.7±3	11,5 ± 7,6	10.2±2.1	9,6 ± 3,6
	485/87	Morado	8.8±2.5	12,7 ± 6,1	9.3±1.8	10,9 ± 3,2
	Arica	Morado	2.4±1.4	6 ± 2,5	4.2±3.3	4,6 ± 3,1

	ENTRADA	TIPO	1º CICLO SIEMBRA	
			Multiplicac.	Peso
GRUPO III (establecidas in vitro en 1998)	Brasileño	Brasileño	Perdido	
	1035	Blanco	Perdido	
	Blanco Valladolid	Blanco	1	0,31 ± 0,23
	Basic I (M.J.)	Blanco	1	0,56 ± 0,6
	Lorenzo	Blanco	1	0,44 ± 0,46
	Saturnino	Blanco	1	0,32 ± 0,26
	Zahorsky	Blanco	1	0,4 ± 0,34
	Huelma J	Blanco	1	1,3 ± 0,85
	Mallorquín	Blanco	1	0,35 ± 0,4
	A.Alvarez	Morado	1	0,14 ± 0,01
	106/87	Morado	1	0,36 ± 0,3
	A.Campo	Morado	1	0,5 ± 0,24
	C. del Obispo	Morado	1	0,75 ± 0,75
	117/86	Morado	1	0,43 ± 0,3
	Chinchón	Rosa	1	1,16 ± 0,4
	Colorados	Chino	1	0,76 ± 0,74
Chino Blanco	Chino	1	2,3 ± 1,5	
Chino CIDACO	Chino	1	1 ± 0,9	

Posteriormente, 10 de estos cultivares libres de virus fueron sometidos a un ensayo de campo para evaluar su comportamiento agronómico (Mansilla, 2000).

## BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL K.C. 1996. Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.*, 16(1): 111-124.
- AMAGASE H., PETESCH B.L., MATSUURA H., KASUGA S., ITAKURA Y. 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.*, 131: 955-962.
- AYUSO P., PEÑA-IGLESIAS A. 1981. The elimination of garlic viruses by therapy and/or tissue culture. *Cell Biol. Int. Rep.*, 5: 835.
- BARANDIARAN X., MARTÍN N., ALBA C., RODRÍGUEZ-CONDE M., DI PIETRO A., MARTÍN J. 1999. An efficient method for the *in vitro* management of multiple garlic accessions. *In Vitro Cell Dev-Pl.*, 35/6: 466-469.
- BARG E., LESEMANN D. -E., VETTEN H.J., GREEN S.K. 1994. Identification, partial characterization and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and Southeast Asia. *Acta Hortic.*, 358: 251-258.
- BARG E. 1996. Serologische und molekulargenetische Untersuchungen zur Variabilität *Allium*-Arten infizierender, filamentöser Viren. Göttingen Univ., Papierflieger, Clausthal-Zellerfeld. pp: 186.
- BARG E., LESEMANN D. -E., VETTEN H.J., GREEN S.K. 1997. Viruses of *Alliums* and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. *Acta Hortic.*, 433: 607-616.
- BHOJWANI S. S. 1980. *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci. Hortic.*, 13: 47-52.
- BLOCK E., AHMAD S., JAIN M.K., CRECELY R.W., APITZ-CASTRO R. 1984. (E,Z)-Ajoene, a potent antithrombotic agent from garlic. *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 8295-8296.
- BORDIA T., MOHAMMED N., THOMSON M., ALI M. 1996. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 54: 183-186.
- BOS L., HUTTINGA H., MAAT D.Z. 1978. Shallot latent virus, a new carlavirus. *Neth. J. Plant Pathol.*, 84: 227-237.
- BOS L. 1992. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Hortic.*, 127: 11-29.
- CHEN J., CHEN J., ADAMS M.J. 2001. Molecular characterisation of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China. *Arch. Virol.*, 146: 1841-1853.

CLARK M.F., ADAMS A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 205-217.

CONCI V. C., NOME S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J. Phytopathol.*, 132: 186-192.

DIEKMAN, 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 Plant Genetic Resources Institute, Rome.

DORANT E., VAN DEN BLANDT P.A., GOLDBOHN R.A., HERMUS R.J.J., STURMANS F. 1993. Garlic and its significance for the prevention of cancer in humans: a critical view. *Br. J. Cancer*, 67: 424-429.

DOVAS C.I., HATZIOUKAS E., SALOMON R., BARG E., SHIBOLETH Y., KATIS N.I. 2001. Comparison of methods for virus detection in *Allium spp.* *J. Phytopathol.*, 149: 731-737.

ETOH T. 1983. Germination of seeds obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. *Jpn. Acad.*, 59B(4): 83-87.

ETOH T. 1985. Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. *J. Fac. Agr. Kagoshima U.*, 13: 77-88.

ETOH T. 1986. Fertility of garlic clones collected in Soviet Central Asia. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 55: 312-319.

ETOH T., NOMA Y., NISFUTARUMIZU Y., WAKOMOTO T. 1988. Seed productivity and germinability of various clones collected in Soviet Central Asia. *J. Fac. Agr. Kagoshima U.*, 24: 29-139.

FAO. 2003. <http://www.fao.org>

GAMBORG O.L., MILLER R.A., OHYAMA K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 148-151.

GHOSH D.K., AHLAWAT Y.S., GUPTA M. D. 1997. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants by thermotherapy and meristem-tip culture. *Indian J. Agr. Sci.*, 67(12): 591-593.

HANELT, P. 1990. Taxonomy, evolution and history. En: Rabinowitch, H.D. and Brewster, J.L. (eds), *Onions and Allied Crops Vol. 1*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp.: 1-26.

HUANG Y., CHEN S.X., HO S.H. 2000. Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests,

Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) and Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.*, 93(2): 537-543.

KANYUKA K.V., VISHNICHENKO V.K., LEVAY K.E., KONDRIKOV E.V., RYABOV E.V., ZAVRIEV S.K. 1992. Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of the potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *J. Gen. Virol.*, 73: 2553-2560.

KELLER E. R. J., FRITSCH R. 1997. Establishment of in vitro clones in the Gatersleben garlic collection. *Acta Etnobotanica*, 92:155-161.

KONVICKA O. 1984. Generative reproduction of garlic (*Allium sativum* L.). *Allium Newsl.*, 1: 28-37.

LOT H., CHOVELON V., SOUCHE S., DELECOLLE B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Dis.*, 82: 1381-1385.

MAAß H. I., KLAAS M. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 89-97.

MANSILLA F. 2000. Comportamiento agronómico de 10 cultivares de ajo libres de virus. *Comunicación I+D 34/00*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca (ed.).

MARTÍN-URDÍROZ N., BARANDIARÁN X., MANSILLA F., GARRIDO J., SÁNCHEZ-TAPIA M.J., MARTÍNEZ J., MARTÍN J. 2001. Mejora sanitaria de un banco de germoplasma de ajo (*Allium sativum* L.) mediante cultivo de yemas axilares. *Actas de horticultura. III Congreso Iberoamericano y IV Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas*.

MESSIAEN C.M., MARROU. 1965. *1<sup>e</sup> Journées Phytiat. Phytopharm, circum-médit.*, Marseille: 204.

MESSIAEN C.M., COHAT J.C., LEROUX J.P., PICHON M.Y., BEYRES A. 1993. *Les allium limentaires reproduits par voie végétative*. INRA. Paris.

MILNER J.A. 2001. A historical perspective on garlic and cancer. *J. Nutr.*, 131: 1027-1031.

MOHAMED-YASSEEN Y., SPLITTSTOESSER W.E., LITZ R.E. 1994. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell Tiss. Org.*, 36: 243-247.

MORICONI D. N., CONCI V., NOME S. F. 1990. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) in vitro. *Phyton* 51(2): 145-151.

MYUNG S.C., EUNSOOK T.K., STEWART T.J. 1982. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. *J. Nutr.*, 112: 241-248.

NAGAKUBO T., NAGASAWA A., OHKAWA H. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell Tiss. Org.*, 32: 175-183.

NOVÁK F.J. 1990. *Allium* tissue culture. En: Rabinowitch H.D. and Brewster J.-L (eds.). *Onion and allied crops. Vol. I.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp: 234-250.

PALUDAN N. 1980. Virus attack on leek: survey, diagnosis, tolerance of varieties and winterhardiness. *Tidsskrift for Planteavl*, 84: 371-385.

PEIWEN X., HUIHENG S., RUIJIE S., YUANJUN Y. 1994. Strategy for the use of virus-free seed garlic in field production. *Acta Hortic.*, 358: 307-311.

PEÑA-IGLESIAS A., AYUSO P. 1982. Characterisation of spanish garlic viruses and their elimination by *in vitro* shoot apex culture. *Acta Hortic.*, 127: 183-193.

POOLER M.R., SIMON P.W. 1993. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature and cold storage. *HortScience*, 28(11): 1085-1086.

POOLER M.R., SIMON P.W. 1994. True seed production of garlic. *Sex. Plant Reprod.*, 7: 282-286.

PRINGLE C.R. 1999. Virus taxonomy 1999: The universal system of virus taxonomy updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. *Arch. Virol.*, 144: 421-429.

RAVNIKAR M., ZEL J., PLAPER I., SPACAPAN A. 1993. Jasmonic acid stimulates shoot and bulb formation of garlic *in vitro*. *Plant Growth Regul.*, 12: 73-77.

REUTER H.D. 1995. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 2. Pharmacology and medicinal application. *Phytomedicine*, 2: 73-91.

SEABROOK J.E.A. 1993. *In vitro* propagation and bulb formation of garlic. *Can. J. Plant Sci.*, 155-158.

SENULA A., KELLER E.R.J., LESEMANN D.-E. 2000. Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for the establishment of an *in vitro* collection of garlic (*Allium sativum*). *Acta Hortic.*, 530: 121-128.

SONG S.I., SONG J.T., KIM C.H., LEE J.S., CHOI Y.D. 1998. Molecular characterization of the garlic virus X genome. *J. Gen. Virol.*, 79: 155-159.

SUMI S., TSUNEYOSHI T., FURUTANI H. 1993. Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *J. Gen. Virol.*, 74: 1879-1885.

VAN DIJK P. 1991. Mite-borne virus isolates from cultivated *Allium* species and their classification into two new rymoviruses in the family Potyviridae. *Neth. J. Plant Pathol.*, 97: 381-399.

VAN DIJK P. 1993a. Survey and characterisation of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Neth. J. Plant Pathol.*, 99 (suppl 2): 1-48.

VAN DIJK P. 1993b. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Neth. J. Plant Pathol.*, 99: 233-257.

VAVILOV N.I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Bot.*, 13: 1-364.

VETTEN H.J., LESEMANN D.-E., MAISS E. 1992. Serotype A and B isolates of bean common mosaic virus are two distinct potyviruses. *Arch. Virol.*, Suppl 5: 415-431.

YAMAGUCHI M. 1983. World vegetables: principles, production and nutritive values. Van Nostrand Reinhold Co. New York. pp: 415.





