

El ajo: virosis, fisiopatías y selección clonal y sanitaria. II Parte científico-experimental

A. PEÑA-IGLESIAS

Este trabajo resume lo publicado hasta la fecha sobre las enfermedades víricas y pseudovíricas del ajo así como sobre la eliminación de éstas. En la primera parte se analizan las características botánicas, fisiológicas, importancia económica y problemática de esta importante especie. También la relación de virus descritos y métodos de obtención de ajos sanos. La segunda parte se refiere a nuestros trabajos a lo largo de 23 años en cuanto a descripción, métodos de identificación de virus, fisiopatías y regeneración sanitaria.

A. PEÑA-IGLESIAS. INIA. CIT. Departamento de Protección Vegetal. Apdo. 8.111. 28080 Madrid.

Palabras clave: Virosis, fisiopatías, selección clonal y sanitaria, ajo, cultivo *in vitro*.

VIRUS DEL AJO IDENTIFICADOS EN ESPAÑA

Sintomatología vírica

Las plantas de ajo con un alto grado de infección por virus presentan un porte más reducido que las aparentemente normales (Figs. 13 y 14), un estriado clorótico-amarillento (Fig. 11) que es el síntoma más frecuente o incluso, ostensiblemente amarillento (Fig. 12) y rizamiento foliar (Fig. 13 y 14). Las cabezas son más pequeñas, entre un 30 a 50% menos, que las normales. Estos síntomas son perpetuales a través de la semilla. Es decir, plantas procedentes (Figs. 15, 16 y 17) de la siembra de dientes de cabezas de plantas marcadas en el campo con estos síntomas, han reproducido los anteriormente síntomas cuando las hemos cultivado reiteradamente en invernadero en condiciones de máxima asepsia; esto es, en tiestos estériles conteniendo mezcla de tierra desinfectada al vapor y el invernadero protegido, con malla antipulgón, de la introducción de vectores o agentes transmisores.

Los anteriores síntomas se corresponden con los descritos en cebolla (BOS, 1976) para

el virus Onion yellow dwarf (OYDV) y, en cierto grado, con los referidos para la mayoría de las virosis del ajo (ABIKO, WATANABE y NISHI, 1980; AHLAWAT, 1974; BOS, 1982; FISCHER, 1975; GALOCHDINA, IVASCHENKO, 1981; GRAICHEN, REICHENBAECHET y LEISTNER, 1985; LA, 1973; MARROV y FAUVEL, 1963; MESSIAEN y ARNOUX, 1960; MESSIAEN y LAFON, 1970; MOHAMED y YOUNG, 1981; PEÑA-IGLESIAS, 1975, 1983 y 1984; TULEGENEV, 1972). Estas referencias no entramos a discutir las para no provocar una confusión de conceptos.

Nuestra experiencia de 18 años en este tema nos lleva a precisar que el rizamiento de las hojas no es síntoma que siempre esté presente, lo cual nos hace pensar que sea efecto de un virus en particular; en nuestra opinión OYDV, por analogía con lo descrito en cebolla (BOS, 1976 y 1982; HENDERSON, 1935; MELHUS, REDDY, HENDERSON y VESTALE, 1929) para este virus y en cierto sentido lo referente al ajo para el mismo virus (DELECOLLE y LOT, 1979; HAVRANEK, 1972; MARROV y FAUVEL, 1964; MESSIAEN y LAFON, 1970).

El estriado clorótico-amarillento o amarillo vivo puede confundirse con los daños produci-



Fig. 11.—A) Estriado clorótico característico de planta virótica. A veces se aprecia un estriado amarillento más ostensible en lugar del clorótico.

B) Estriado clorótico-amarillento debido a virus. Síntomas parecidos pueden deberse a ataque de ácaros.



Fig. 12.—A) Planta de ajo muy virosada. Obsérvese fuerte raquitismo, retorcimiento, rizado foliar y estriado clorótico.

B) Similar a la anterior. Menos raquitismo. Rizado foliar. Compárese con ajos contiguos de aspecto normal (también están virosados) pero con menor grado de degeneración por virus.

dos por infestaciones de ácaros-eriofidos (SMALLEY, 1956) como *Aceria tulipae*. Recientemente, en Filipinas (AHMED y BENIGNO, 1985), han relacionado el síntoma estriado-amarillento con un virus transmisible por el ácaro *Aceria tulipae*. No obstante este trabajo necesita ser confirmado por otros investigadores.

Mediante la inoculación de plantitas sanas, procedentes de cultivos de meristemos apicales, con suspensiones purificadas de virus de ajos de Cuenca, hemos reproducido los síntomas que hemos descrito. No obstante en aquellos momentos pensábamos que solamente teníamos un solo virus en ajo (un potyvirus); ahora sabemos que los ajos conquenses están infectados por dos o más potyvirus diferentes.

En relación con el número de dientes (Fig. 15) hemos observado menor número en ajos muy atacados que en plantas de relativo aspecto normal. Esto lo hemos comprobado por siembra de dientes e incluso en inoculaciones de plantitas de meristemos con jugos de hojas enfermas.

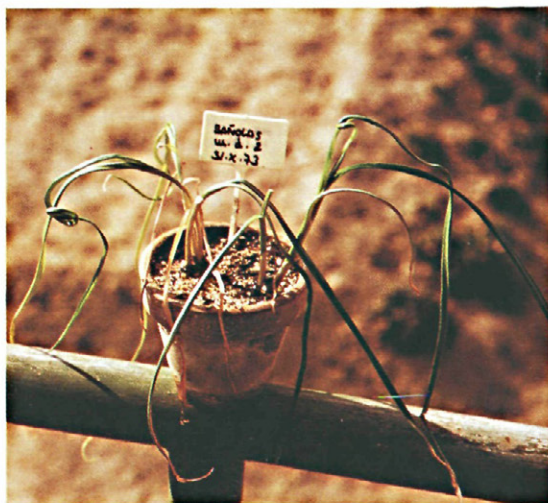


Fig. 13.—Plantas procedentes de la siembra de dientes de plantas degeneradas de la variedad "Bañolas". Obsérvese rizamiento foliar que junto al estriado clorótico son síntomas perpetuables a través de la simiente, lo cual indica que son síntomas de virus.

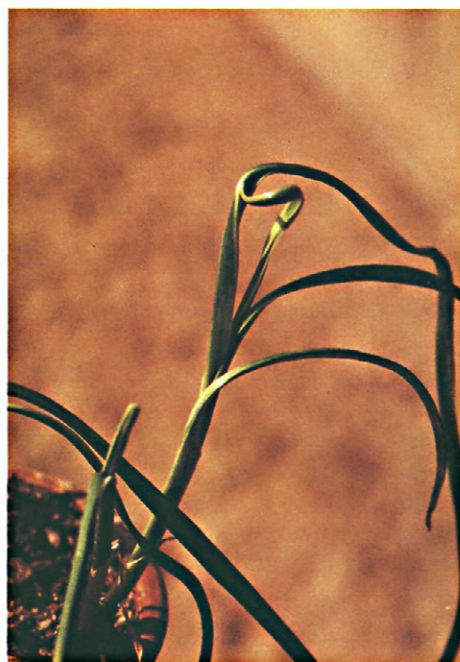


Fig. 14.—Similares a la anterior. Detalle de rizamientos foliares y estriados cloróticos procedentes de siembra de dientes de ajos degenerados de Las Pedroñeras (Cuenca).

En definitiva hemos detectado 5 virus en ajo y hasta que los podamos aislar e inocular clones sanos con suspensiones víricas axénicas de estos virus, para cumplimentar el Tercer Postulado de Koch, no sabremos la exacta sintomatología de cada uno de los virus y de sus combinaciones.

Resumiendo, los síntomas de virus en los ajos conquenses, según nuestra experiencia de 18 años y el resultado de nuestros trabajos nos lleva a decir que son: rizamiento o no de las hojas, estriado clorótico o clorótico-amarillento (en el que debe destacarse el ataque de ácaros), reducción variable de crecimiento y del bulbo.

Fisiopatías

Durante nuestras innumerables horas de campo observando síntomas y tomando muestras (lo cual debe hacerlo en la mayoría de los casos el Investigador Principal de un tema y no aisladamente los colaboradores del mismo) así como en las incontables visitas a almacenes de ajos, ambos en todas las zonas del territorio nacional dedicado al cultivo del ajo, hemos observado una serie de alteraciones tanto en plantas como en cabezas de ajo, algunas de las cuales nos llevaron a pensar en determinados momentos que eran debidas a infecciones de virus. De esta forma marcamos determinadas plantas en campos de Canarias, Cuenca, Granada, Salamanca, etc., y recogimos los bulbos correspondientes (cuando no los habían cosechado antes). Posteriormente incubamos dientes de estos bulbos en frigorífico a +4° C y cultivamos en invernadero con luz suplementaria o sometimos bulbos en tiestos, de plantas normales, con períodos de frío (4° C) en habitación frigorífica y llegamos a las siguientes conclusiones en cuanto a las alteraciones fisiológicas o fisiopatías de las "enfermedades" que, bajo el nombre dado por el agricultor, vamos a describir por vez primera:

AJOS EMBASTECIDOS O AJOS POTRA. Así llamados, respectivamente, por los



Fig. 15.—Gradación de ajos de Lanzarote degenerados desde uno de apariencia normal hasta ajos con 3, 2 y un sólo diente de aspecto bulbiforme. Son llamados ajos degenerados o ajos "porros" (de puerro) por los agricultores. Esto puede ser debido a: 1) Fotoperíodo escaso por adelantamiento de siembra. 2) Crecimiento raquíptico debido a infección vírica. 3) Falta de frío suficiente para romper la dormición de yemas axilares que darían lugar a los dientes. Después de plantar ajos sin virus (regenerados por nosotros) se ha visto una disminución importante de ajos "porros" por lo cual los virus influyen muy directamente en esta anomalía.

agricultores granadinos y conquenses. Las protuberancias, hernias o potras (Fig. 16 A) que se observan en las cabezas así denominadas corresponden a dientes o bulbos adventicios o "supernumerarios" de los normales de la cabeza (Fig. 16 B). Este diente o bulbo se origina por una rotura de la dormición de una yema axilar de un catáfilo u hoja protectora externa del diente sembrado, por un exceso de frío, durante el período dormición-bulberización (formación del bulbo). Estas yemas brotan dando lugar a hojas y se cargan de reservas evolucionando a dientes o incluso bulbos. Exteriormente aparece una excesiva frondosidad (Fig. 16 A).

AJOS CLAVELLINOS. No es más que un ajo potra múltiple, es decir, el frío ha roto la dormición no de una yema axilar externa sino de varias (Fig. 19). Esta denominación es propia de La Mancha Conquense.

AJOS FLORONES. Este término, también manchego-conquense, designa aquellas plan-



Fig. 16.—A) Ajo “potra” (denominación del agricultor conquense) o ajo “embastecido” (denominación granadina). Las protuberancias (hernias o potras) que se observan corresponden a dientes adventicios originados, en nuestra opinión, por una evolución vegetativa de las yemas axilares latentes de los catafilos. En la parte aérea se aprecia un pequeño penacho de hojas que corresponden a dientes brotados. Este ajo es objeto de destrío.
 B) Detalle de lo anteriormente expresado, donde se aprecia el diente adventicio (otras veces bulbo). Esta fisiopatía creemos se produce por un exceso de horas de frío en el período dormición-bulberización.

tas con múltiples brotes (Fig. 19) procedentes de la rotura de la dormición, de las yemas de la corona de dientes externa del bulbo, por el frío, después de la bulberización. De esta manera se forma una cabeza con varios “tallos” (Fig. 18), que, cortados durante la recolección o en almacén, dan la imagen de varios “vástagos” con aspecto de florón (Fig. 17).

AJO PORRO O AJO CEBOLLA. Denominación de Canarias, Granada y La Mancha. Se debe al aspecto de cebolla que presentan algunas cabezas de ajo al ser cosechadas (Figs. 21 y 22). Este es un caso muy interesante que va desde la formación (Fig. 15) de una cabeza, con aspecto de bulbo tunicado), sin dientes o bulbillos, por freno de la evolución de la dormición de una sola yema que es la que origina el bulbillo o ajo cebolla o porro; a la formación de una cabeza con 2, 3 ó más dientes o bulbillos, al evolucionar las corres-

pondientes yemecillas de la base exterior del disco o platillo del diente sembrado. Las hojas protectoras o catáfilos externos se cargan de sustancias de reserva (Fig. 22) asemejándose a las túnicas o “cascos” de la cebolla. Las causas de estas fisiopatías son un fotoperíodo inferior al que necesita una variedad para formar el bulbo en el período de bulberización, suelos húmedos con exceso de nutrientes (N), inhibición de yemas por períodos de calor o frío u otras causas en el inicio de la bulberización o incluso la acción de los virus al reducir el crecimiento como hemos comprobado en las inoculaciones víricas de plantitas sanas procedentes de cultivos de meristemos.

En Canarias (concretamente en Lanzarote) los agricultores los llaman ajos “porros” o “degenerados”. Nosotros hemos regenerado una buena cantidad de ajos de Lanzarote mediante cultivo *in vitro* de meristemos apicales.



Fig. 17.—Ajo “florón” (denominación conquense). Creemos se produce cuando las yemas principales de los dientes de una cabeza de ajo ya formada (después de la bulberización) brotando un gran penacho de hojas (florón). Esta fisiopatía, que así describimos, consideramos tiene como causa un período fuerte de frío después de la bulberización. En la recolección al cortar la cabeza correspondiente queda no solo un brote sino varios. (Estos ajos son objeto de destruído). *Observación.* Las hojas externas están atacadas de “Roya” (debida al hongo *Puccinia allii*) que no tiene nada que ver con esta fisiopatía.



Fig. 18.—A) Bulbo de ajo florón (Las Pedroñeras).

B) Este síntoma puede ser perpetuable, eventualmente, a través de la simiente. Según nuestra experiencia hasta un 10%. Esto se explica por una inducción, por el frío, de la rotura de la dormición de las yemas principales de los dientes. Al siguiente cultivo (3^o) no se perpetúa más.



Fig. 19.—Ajo clavellino. A) Es un ajo "potra" múltiple. Es decir, se han desarrollado varios dientes adventicios a partir de la rotura de la dormición de las respectivas yemas axilares de los catáfilos externos. Destino: destrío. B) Planta de ajo "clavellino" en el campo. Las Pedroñeras (Cuenca).



Fig. 20.—Comparación entre ajo clavellino y florón.
Nota. Es curioso que en la propaganda de ciertos electrodomésticos hace 2 años figurara un ajo potra, en los anuncios, con la buena intención de mostrar un ajo de calidad.



Fig. 21.—Ajo cebolla. Cabeza de ajo con aspecto de cebolla, de ahí el nombre.

Estos ajos se cultivaron en el ICIA o antes llamado CRIDA 11 (exactamente en la Finca de Güimar). En 1982, entregamos al CRIDA 11, 2 partidas de ajos regenerados sanitariamente que incluían 2 subtipos que detectamos dentro de la variedad Lanzarote, con un total de 200 cabezas. Las cabezas procedentes del cultivo de estos ajos no mostraron en años sucesivos síntomas de degeneración ni ajos "porros" lo cual es otra prueba más, aunque indirecta, de que los virus pueden también originar esta alteración.

Todos los ajos potras, florones, clavellinos y cebollas o porros son objeto de destrucción. Es posible que algunas de estas fisiopatías puedan reducirse eligiendo convenientemente la variedad, experimentando un tratamiento de frío artificial antes de la siembra, etc. Para ello se necesitaría algo que hasta hoy no ocurre: atención a la investigación de este importante cultivo.

Inoculaciones efectuadas

Durante los 18 años que llevamos investigando sobre los virus de esta especie y sobre su regeneración sanitaria hemos efectuado innumerables inoculaciones o transmisiones experimentales de virus partiendo de jugos o extractos de hojas enfermas, convenientemente tamponados (YARWOOD, 1972) y con la adición de diversas combinaciones de sustancias antioxidantes (2-mercaptoetanol, clorhidrato de cisteína, etc.), inhibidores de las fenolasas como dietilditiocarbomato de sodio (DIECA) e incluso pectinasas. Empleamos abrasivos, como carborundo (400-600 mesh) o celite, espolvoreados sobre las plantas a inocular o añadidos al inóculo. Utilizamos tampones (YARWOOD, 1972) o Sorensen a diferentes pH 6,5; 7; 7,5. Efectuamos las inoculaciones, con o sin previo oscurecimiento de las plantas, en diferentes temperaturas (10; 15; 20; 25° C) y utilizamos un amplio espectro de plantas susceptibles a infecciones víricas por este procedimiento: *Chenopodium ambrosioides*, *Ch.*

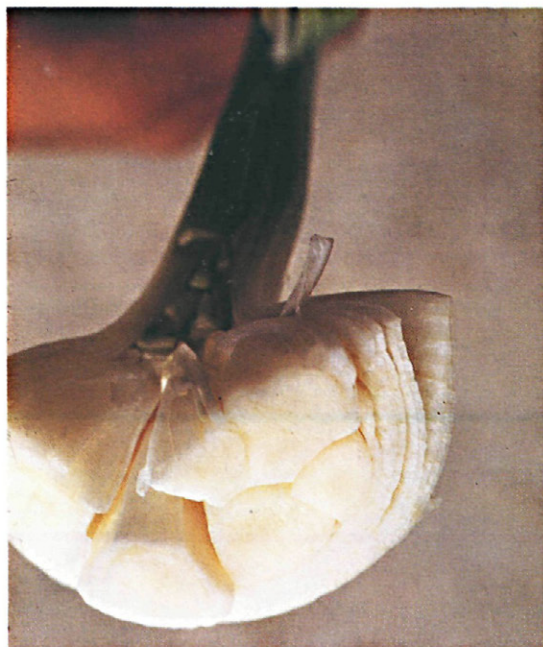


Fig. 22.—Cortes de un ajo-cebolla. Los catáfilos externos u hojas protectoras se han cargado de reservas (como los cascos de la cebolla) tomando el aspecto de un bulbo tunicado. Esta fisiopatía (en nuestra opinión) ocurre en terrenos muy abonados y en las zonas donde "duerme" el agua y hay mayor abundancia de elementos solubles. También el excesivo calor o frío o incluso la falta de frío pueden frenar la evolución de la yema principal. Los virus también juegan un papel importante.

amaranticolor, *Ch. foetidum*, *Ch. quinoa*, *Ch. murale*, *Phaseolus vulgaris*, *Gomphrena globosa*, etc., así como liliáceas reproducidas de semilla tales como, diversas variedades de cebolla y de puerro. Después de los diversos frotamientos de los incontables inóculos no observamos ningún síntoma de virus en las plantas infectadas experimentalmente.

Sólomente en un caso observamos la reproducción de la sintomatología (Fig. 24) antes descrita sobre la variedad "Puerro verde de Charentain" inoculada con jugo o extracto de hojas enfermas estabilizado en tampón Sorensen pH 7, adicionado de sulfito de sodio. La inoculación se efectuó a 20° C.

La inoculación la efectuamos con un "dermoinyector" (Fig. 23) de los empleados en

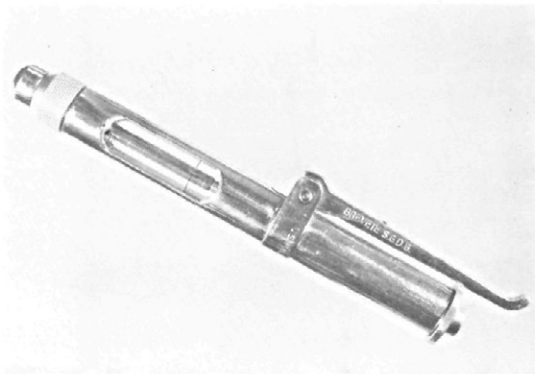


Fig. 23.—Dermoinyector a presión utilizado en inoculación mecánica de jugo foliar tamponado de ajos virosados.

Medicina Clínica para vacunaciones subcutáneas.

Este experimento fue repetido sin éxito por varios de nuestros colaboradores utilizando diferentes fuentes de virus y muchas variedades de puerro.

Sin embargo las transmisiones puntuales que, empleando áfidos alados de *Myzus persicae* efectuamos personalmente en dos ocasiones, resultaron positivas.

Los áfidos fueron tomados de plantas de pimiento sin síntomas de virus. La adquisición de virus se efectuó durante una hora sobre hojas de ajos enfermos colocadas en cajas Petri. Empleamos 10 - 20 pulgones alados por experimento. La inoculación se efectuó durante un período de 24 horas, sobre plantitas sanas regeneradas sanitariamente por cultivo de meristemos, encerradas en jaulas de tela metálica. A las 24 horas los áfidos fueron aniquilados con un insecticida de contacto. Al cabo de 1 mes aparecieron las estrías cloróticas y a los 2 meses el rizamiento foliar. El tamaño de las plantas inoculadas fue mucho más reducido (casi un 40%) que las no inoculadas.

Un experimento similar lo efectuamos en un intento de reproducir el Tercer Postulado de Koch por inoculación mecánica de extractos foliares o dializado de la banda inferior ZI sobre plantitas sanas de cultivos de meriste-



Fig. 24.—Una sola fuente de virus resultó infecciosa en puerro por este procedimiento de inoculación por dermoinyección. Los síntomas de estriado y rizamiento foliar aparecieron y la planta resultó estar infectada por partículas de un potyvirus.

mos. Los resultados fueron similares a los expresados para la inoculación por áfidos pero no observamos rizamientos foliares.

Immunología: reacciones serológicas (microfloculación, inmunodifusión, ELISA)

El año 1974 preparamos personalmente un antisuero de potyvirus purificados directamente de hojas de ajos. Para ello utilizamos las respectivas bandas inferiores (Fig. 38) obtenidas en las centrifugaciones de gradientes de densidad de sacarosa (aproximadamente situadas a 50 mm. del menisco de los tubos); la pauta de inmunización del conejo que segui-

mos fue una inyección intravenosa inyectada en la vena marginal de la oreja seguida por 2 intramusculares (emulsionadas en adyuvante incompleto de Freund) a intervalos de 7 a 10 días, terminando con otra intravenosa. El título de este antisuero determinado por microprecipitación bajo parafina resultó bastante alto 1/1.024. Las proteínas normales de la planta las eliminamos por sucesivas incubaciones con jugos de hojas de ajos de meristemos, así como con otras de cebollas y puerros procedentes de semilla.

Con el anterior antisuero realizamos varios tests de microfloculación (PEÑA-IGLESIAS, AYUSO, 1973) bajo parafina (técnica de Van Slogteren) así como de inmunodifusión en agar (PEÑA-IGLESIAS, AYUSO, 1973) previa fracturación de partículas víricas en fragmentos difundibles en agar (PEÑA-IGLESIAS, AYUSO, 1973), con la adición al jugo foliar, que empleamos como antígeno o al medio de gel de agar, de sulfato dodecil de sodio o SDS. Esta última técnica no nos satisfizo debido a que, para que realmente funcione con los "potyvirus", requiere antisueros preparados con SDS, es decir, fragmentos de partículas víricas que proporcionan homólogos fragmentos de

Por el contrario y, pese a la difícil eliminación de las proteínas de la planta, la técnica de microfloculación bajo parafina resultó buena a partir de diluciones del antisuero de 1/8.

Desafortunadamente este antisuero se perdió durante el traslado del Laboratorio según me comunicó un colaborador y otro preparado posteriormente no resultó bueno.

Técnica ELISA. Método standard DAS ELISA (Clark & Adams, 1977)

Recientemente y utilizando antisuero preparado comercialmente del virus OYDV (Kit Inotech) hemos puesto a punto la técnica ELISA, de la forma siguiente:

Material: a) Placas Cooke Microtiter; b) Tampones: Carbonato 0,05M pH 9.6; PBS-T,

es decir, 11 de PBS 0,02M pH 7,4 con la adición de 0,5 ml de Tween 20; tampón conjugado del Kit Inotech; tampón del sustrato: 10% de dietanolamina ajustado a pH 9,8 con HCl. c) Antisuero OYDV y conjugado del Kit Inotech; d) Sustrato p-nitrofenil fosfato disódico (PNP) de Sigma.

Método: Se añaden a cada pocillo 200 μ l de cada muestra (jugo de hojas infectadas) diluida 1:10 en tampón PBS-T. Se incuban las placas a 4° C durante 19 horas (toda la noche). Se lava 3 veces con agua destilada. Se añaden a cada pocillo 200 μ l de conjugado específico (de antisuero OYDV) diluido: 1:1000 en tampón conjugado. Se incuban a 36° C durante 4 horas. Se lava 3 veces con agua destilada. Se añaden a cada pocillo 200 μ l de sustrato adecuado diluido 1 mg/ml en tampón dietanolamina. Se deja a temperatura ambiente hasta que reaccione. Se efectúan las lecturas visuales o con el fotómetro Titertek Multiskan. *Nota.* En cada incubación se tapan o cubren las placas con polietileno adhesivo para evitar evaporaciones.

De esta forma hemos llevado a cabo la técnica ELISA (CLARK y ADAMS, 1977) incluso con ligeras modificaciones (CLARK y BARJOSEPA, 1984; PAIVA, DANIELS, ASSION y CASTRO, 1984). En general, como fuentes de virus de ajos hemos utilizado hojas pertenecientes a muchas plantas de Las Pedroñeras, Mota del Cuervo, etc., con claros síntomas o incluso con síntomas dudosos. Como testigos hemos empleado extracto de hojas provenientes de plantas saneadas por cultivo de meristemos, con diagnóstico negativo por microscopía electrónica y por inmunomicroscopía electrónica o microscopía electrónica de inmunosorbentes ISEM-P. Como puede verse en la Fig. 37 la reacción fue fuertemente positiva, a las pocas horas, (coloración amarillo intensa) en las filas 2, 3, 4, 5 y 6, excepto los 3 pocillos de la fila 1 relleno sólo con tampón para control (blanco) y el de la 4.ª fila arriba en el que no se empleó jugo de ajos por error. En las filas 7 a la 11 se emplearon jugo de tabacos inoculados con virus Y de la patata y jugo de hojas

de ajos regenerado por meristemos (ninguna coloración o reacción).

Si continuamos este trabajo, lo cual debería ser lógico después de una experiencia de 18 años, llevaríamos a cabo para virus del ajo técnicas modernas como SADI (GRADDON y RANGLES, 1986).

De cualquier forma con la técnica ELISA, como se ha descrito, es posible detectar el OYDV en ajo.

Estudio de efectos citopáticos por microscopía fotónica. Diagnóstico sencillo, específico, económico y eficaz.

No hay nada publicado sobre el estudio de efectos citopáticos debidos a virus en ajos mediante microscopía óptica o fotónica. Consideramos que la utilización de los colorantes específicos empleados por Christie (CHRISTIE y EDWARDSON, 1977, 1986) podría ser una técnica sencilla para la identificación rápida de los virus del ajo. En efecto, hemos tomado tiras de epidermis de hojas enfermas y sumergido las zonas arrancadas en la mezcla de colorantes O-G (CHRISTIE y EDWARDSON, 1977, 1986) durante un tiempo de 20 minutos, doble que el recomendado (CHRISTIE y EDWARDSON, 1977, 1986) como nos ha ocurrido con otros patógenos y otras plantas (PEÑA-IGLESIAS y VECINO, 1987). Tras el lavado y deshidratado en alcohol absoluto y montado entre cubre y porta pueden observarse al microscopio óptico. De esta forma, en un tiempo total de 30 minutos, pueden detectarse grupos de inclusiones cilíndricas (ic) (Fig. 26) en citoplasmas. Estas ic pueden compararse con otras observadas en secciones ultrafinas por microscopía electrónica (compárense las Fig. 26 con la Fig. 34).

Este método, no publicado todavía por nosotros, permite diagnosticar los potyvirus del ajo en menos de media hora. Y sólo es necesario un fotomicroscopio con objetivo de inmersión capaz de 1.500 a 2.000 aumentos, los colorantes específicos, útiles citológicos y un

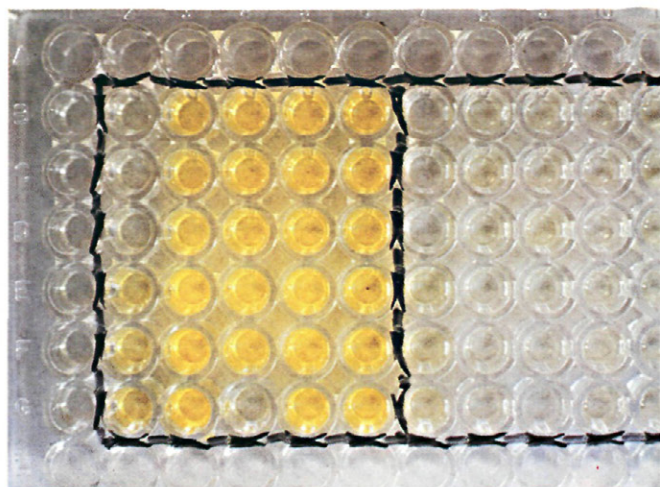


Fig. 25.—Técnica ELISA que identifica uno de los potyvirus que infectan los ajos de Cuenca con el virus "Onion yellow dwarf". En la parte izquierda de la placa se ha utilizado antisuero del OYDV y en la derecha antisuero del PVY (Virus Y de la patata). Se hicieron tests de 9 plantas procedentes de Cuenca (diferentes plantaciones). Se consideraron 3 repeticiones por muestra. El último pocillo en la tercera columna es blanco ya que por error no se echó muestra (virus). Las partes no amarillentas no tomaron color debido a la ausencia de virus OYD. En los 3 pocillos de la primera columna de la izquierda se puso jugo de planta procedente de cultivo de meristemos (o sea saneada).

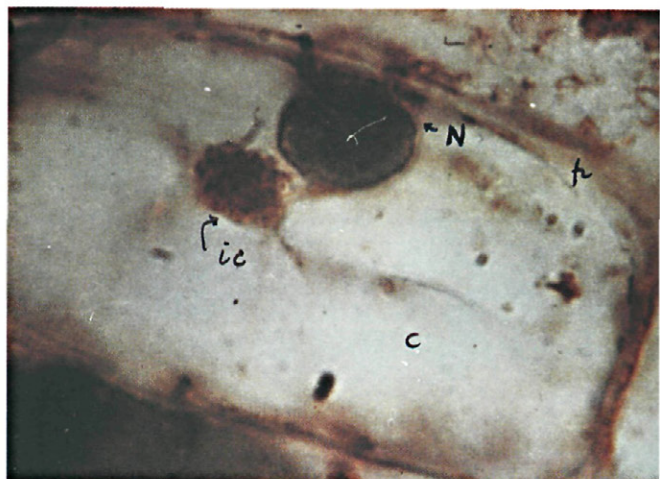


Fig. 26.—Célula de tejido epidérmico de ajo de Cuenca teñida con O-G. Puede observarse: N = núcleo; n = nucleolo; p = pared celular; c = citoplasma; ic = inclusión cilíndrica. Puede compararse esta ic con las que se observan en la Fig. 34. Estas inclusiones son características de la infección por un potyvirus.

poco de adiestramiento en citología y en diferenciación de orgánulos celulares. Creemos que puede ser de gran interés para el control de plantas sanas, especialmente en el aspecto de comprobar las plantas re infectadas y erradicarlas convenientemente si están verdaderamente enfermas.

No hemos podido todavía observar las inclusiones producidas por el carlavirus que infecta a los ajos españoles ya que, posteriormente a la puesta a punto de esta técnica que efectuamos personalmente, no hemos localizado ninguna planta que tuviera una infección por carlavirus.

En un muestreo reciente, a escala nacional, encontramos los efectos citopáticos mencionados (ic) en todos los ajos estudiados. Estas variedades fueron: Ajos de Córdoba, Balazote (Pedroñeras cultivado en regadío), Bañolas, Chinchón basto, Chinchón fino, Lanzarote, Pedroñeras y Salamanca. El número de cabezas estudiadas fue de 5 por variedad o procedencia tomados al azar de bolsas de 3 kg (aproximadamente 25 cabezas por bolsa).

Esta técnica sería de extraordinaria utilidad para el Servicio de Inspección Fitopatológica ya que a veces permite no solo detectar virus sino identificarlos (CHRISTIE y EDWARDSON, 1986; PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1973). E incluso viroides (PEÑA-IGLESIAS y VECINO, 1986 y 1987).

Microscopía electrónica

Morfología vírica

Para la puesta de manifiesto de partículas víricas hemos empleado esencialmente la técnica de tinción negativa con ácido fosfotungstico (PTA) al 2%, pH 6,9, mezclando una gota de extractos de hojas infectadas o de una suspensión purificada de virus con una gota del colorante negativo antes mencionado (PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1973). De esta forma hemos encontrado partículas flexuosas de

unos 750 nm de longitud (Fig. 27) las cuales corresponden a partículas víricas de un potyvirus (HOLLINGS y BRUNT, 1981).

Probablemente hemos efectuado más de 1.500 tinciones negativas, en 18 años estudiando ajos, y en todas hemos encontrado partículas víricas flexuosas de unos 750×12 nm, es decir, partículas de potyvirus, lo cual si tenemos en cuenta que las muestras han procedido de todas las regiones donde se cultiva el ajo, nos lleva a afirmar rotundamente que todos los ajos españoles están afectados por un potyvirus.

Estas partículas (Fig. 27) son rígidas en algunas microfotografías tomadas con el microscopio electrónico o electrografías (como a nosotros nos gusta denominarlas). Esto es debido a presencia de iones Mg^{2+} y se convierten en flexuosas con la adición de un agente quelante como EDTA (HOLLINGS y BRUNT, 1981). Incluso la longitud cambia ligeramente.

Para calcular las dimensiones normales hemos seguido el método que Brandes publicó en 1964 (PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1973) y que consiste en medir las partículas de diversas microfotografías y tomar una media ponderada de aquellas cuyas longitudes corresponden al mayor número de partículas (Fig. 41). De esta forma podemos decir que las dimensiones del potyvirus que hemos encontrado infectando ajos españoles es de 750×12 nm.

En otras ocasiones hemos empleado acetato de uranilo, en lugar de PTA, en solución acuosa al 2%.

El ajo, como el albaricoque, tiene muchas pectinas y, concretamente, el jugo de hojas enfermas también. Para ello hace tiempo (1968-70) se nos ocurrió emplear pectinasa en solución acuosa (1%). Comentamos que las preparaciones resultaban más limpias, especialmente sin las fibras de pectinas que, para una persona no experta, pueden confundirse con partículas víricas. Hoy se utiliza en ajo (DELECOLLE y LOT, 1981) en tinciones negativas, transmisiones, en inmunoelectromicroscopía, etc.

En algunos casos, muy pocos, menos de un 5% en ajos conquenses, hemos detectado partículas de 580×12 nm que pueden corresponder a un carlavirus (WETTER y MILNE, 1981) o virus perteneciente a un grupo cuyo prototipo es el Carnation Latent Virus. Estas partículas se encuentran más a menudo en ajos de Salamanca y de Soria y prácticamente nada en los de Bañolas, Canarias y Chinchón.

Morfología de inclusiones víricas

Es frecuente para nosotros, no así para muchos colegas extranjeros (Francia, USA), encontrar láminas de inclusiones cilíndricas en

tinciones negativas de extractos de hojas enfermas, (Fig. 28). Estas láminas son perfectamente rectangulares lo cual indica que su inclusión es cilíndrica y no cónica (Fig. 31). Estas inclusiones las hemos encontrado en todas las variedades de ajos cultivadas en España, Bañolas, Blanco de Córdoba (Chinchón basto), Chinchón fino y basto, Lanzarote, Morado de Pedroñeras, Salmantino, etc.

En pocas ocasiones hemos visto un virus esférico (isométrico) en tinciones negativas de ajos de Soria. No hemos podido identificarlo. Sabemos que sólo está hoy descrito el virus del mosaico del pepino infectando ajo con esta morfología (STEFANAC, 1980).

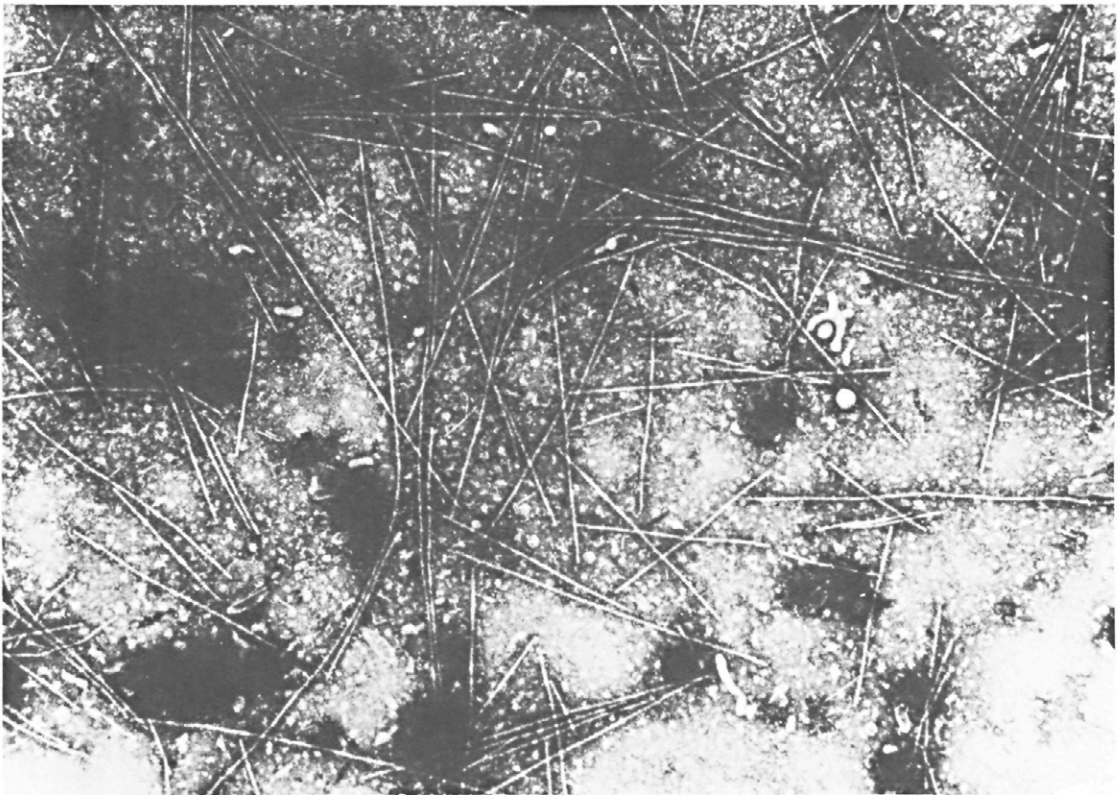


Fig. 27.—Electrografía de una tinción negativa de un extracto foliar teñido con PTA. Muestra de ajos enfermos de Las Pedroñeras. Aumentos 31.920 x.

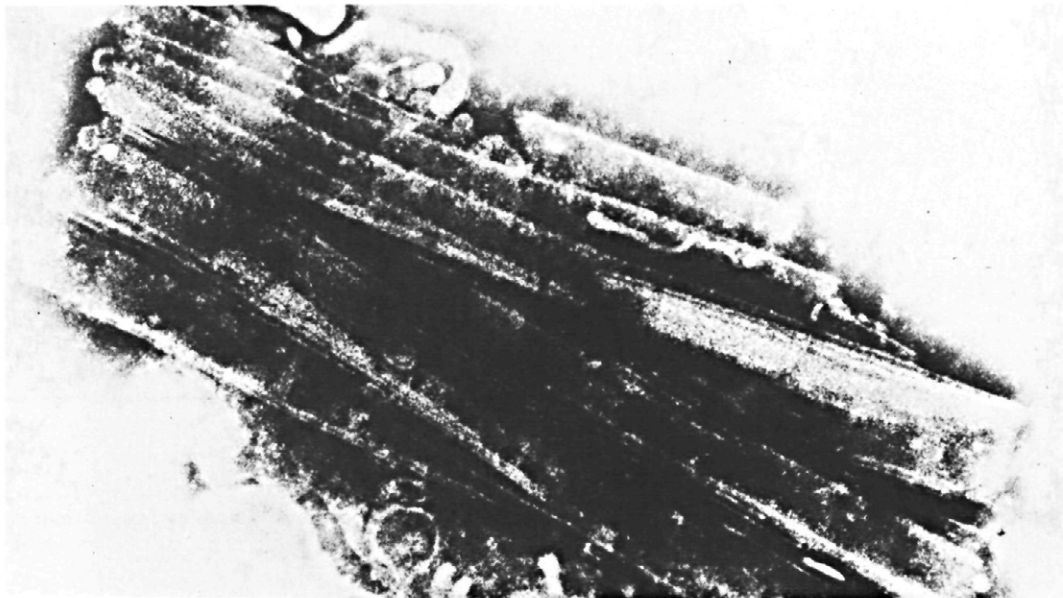


Fig. 28.—Electrografía de tinción negativa de extractos de hojas de ajos enfermos, Las Pedroñeras, con PTA (pH 6,9). Pueden observarse láminas rectangulares características de una inclusión cilíndrica. Los mismos resultados se han obtenido con ajos procedentes de todas las regiones productoras españolas: Bañolas, Córdoba, Cuenca, Chinchón, Lanzarote, Salamanca, Soria, Zamora, etc. Por tanto pensamos que por lo menos hay un virus del tipo Y o Potyvirus que infecta crónicamente todos los ajos de España.

Ultraestructura celular

El estudio de las secciones ultrafinas de tejidos enfermos mediante microscopio electrónico ha llegado a ser un medio de caracterización de virus y aún más en el caso de los potyvirus. La técnica está ampliamente descrita (PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1973) y no es ocasión de repetirla.

En células enfermas hemos observado muchas alteraciones (PEÑA-IGLESIAS, FRESNO y SHEPHERD, 1982). Hay gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso asociado con muchas vesículas y dictiosomas (Fig. 29). Los cloroplastos y las mitocondrias están extraordinariamente desorganizados (Fig. 29), observándose, a veces, cuerpos circulares (Fig. 30) que son muy posiblemente mitocondrias degeneradas. Otras veces queda la duda (Fig. 30).

Se observan muchas secciones de inclusiones cilíndricas y para la comprensión de este

importante punto vamos a hacer un paréntesis.

Todos los virus pertenecientes al grupo de los potyvirus inducen la formación de inclusiones intracelulares citoplásmicas. Estas inclusiones fueron en un principio descritas como cilíndricas (Fig. 31) aunque algunas, al menos durante las primeras etapas de su desarrollo pueden ser de forma cónica (Fig. 31). Inclusiones morfológicamente similares las inducen algunos otros virus flexuosos que no son transmisibles por áfidos sino por hongos del género *Polymixa*, por ácaros eriófidos o incluso por aleirodidos. En este sentido es de destacar el virus flexuoso de ajo encontrado también en el ácaro *Aceria tulipae* (AHMED y BENIGNO, 1985) así como los trabajos rusos (TAHERMUSHKINE, 1974; TULEGENEV, 1972) que relacionan otro virus flexuoso de cebolla con este mismo ácaro, aun cuando, teniéndolos muy en cuenta, todavía estemos algo escépticos de es-

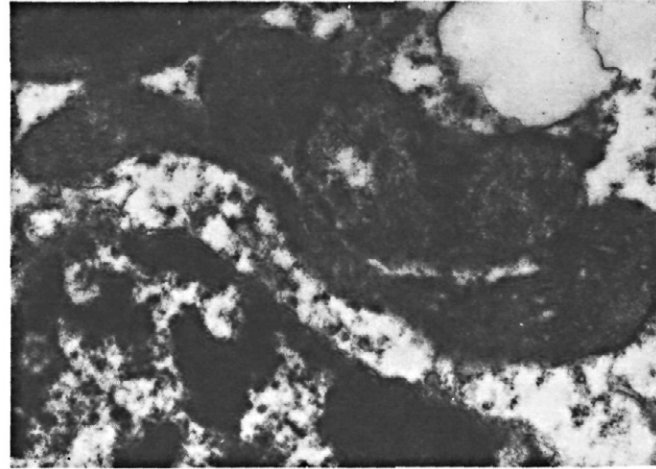
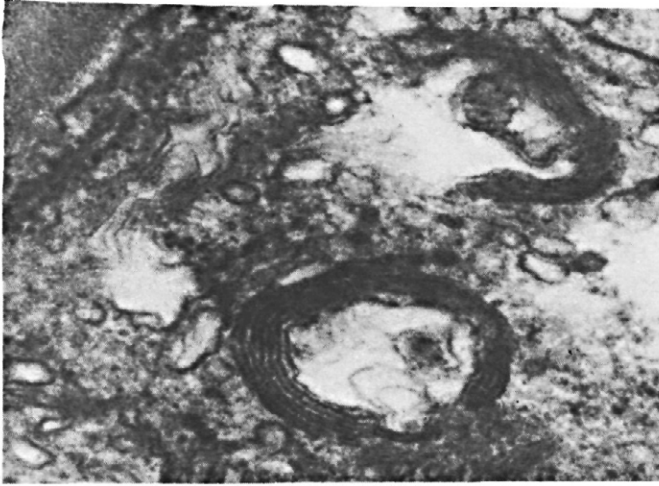


Fig. 29.—A) Ultrasección de tejido de ajo enfermo vista al microscopio electrónico. Se observa gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso asociado con muchas vesículas y dictiosomas.
B) Mitochondrias y cloroplastos extraordinariamente alterados en ajos viróticos.



Fig. 30.—A menudo se observan cuerpos circulares que, a veces, son mitocondrias degeneradas.

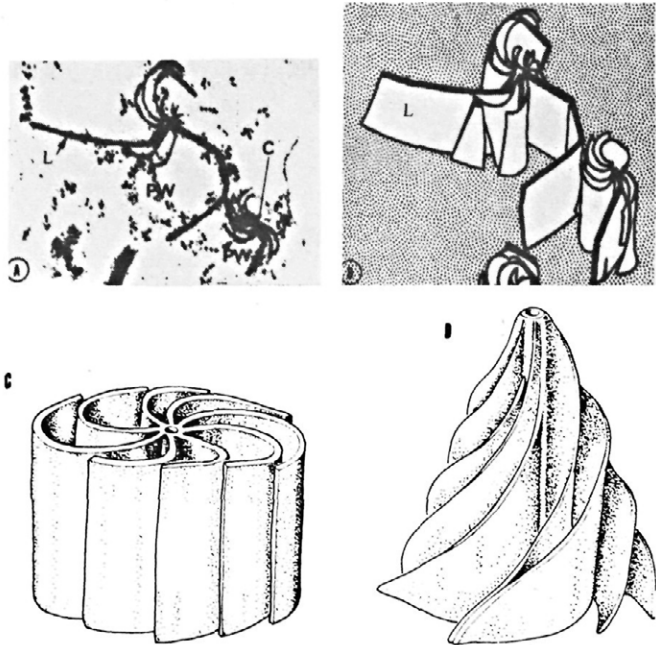


Fig. 31.—1) A. Fotografía. B. Dibujo. Tomados de Edwardson (1966). El dibujo B representa la forma tridimensional de una inclusión cilíndrica cuyas secciones transversales corresponden a una roseta (pinwheel=pw) de la electrografía A; L=lámina de la inclusión cilíndrica (ic).
2) C. Modelo de una inclusión cilíndrica. D. De una inclusión cónica. Tomados de ANDREWS SHALLA (1974, *Phytopathology*, 62:1234-1243).

tos hallazgos. Este grupo de virus no transmisible por áfidos no puede clasificarse en el grupo de los potyvirus que son los virus afines al Y, morfológicamente, que inducen inclusiones cilíndrica o cónicas y son transmisibles por áfidos.

Las inclusiones que tienen láminas rectangulares (Fig. 31) son cilíndricas y las triangulares (Fig. 31) cónicas. Las secciones transversales se denominan "pinwheels" (pw) o rosetas (r). En sección longitudinal "bundles" (b) o haces (h). Las láminas de la misma o de una inclusión adyacente están muy juntas o incluso fusionadas parcialmente. Estas láminas así dispuestas se llaman, en sección transversal, agregados laminares o LA. El margen externo de una lámina puede enrollarse hacia adentro. Si tal estructura la cortamos transversalmente se denomina círculos (c) ó "scrolls" (s) y tubos (t) "tubes", si se corta longitudinalmente.

Las inclusiones cilíndricas o cónicas se originan en los plasmodesmos (por el genoma del virus y son de naturaleza protéica pero diferente proteína de la del virus). Posteriormente se acumulan en el citoplasma, a veces formando grandes agregados con orgánulos y partículas (inclusiones amorfas) se detectan fácilmente por microscopía óptica. Ejemplos de lo an-

terior los tenemos en la Fig. 32, así como en las Figs. 32, 33 y 34.

Edwardson (1974) ha establecido 3 subdivisiones:

- I Cuando aparecen tubos o círculos
- II Cuando aparecen agregados laminares
- III Cuando aparecen tanto tubos o círculos como agregados laminares.

De esta forma vemos que todos los potyvirus (Figs. 32 y 33) que hemos identificado en España podemos situarlos en la subdivisión I donde se encuentra el virus OYDV. No obstante en un ajo var. "California late" enviado por el Prof. Robert Shepherd de la Universidad de California (Davis) detectamos LA (PEÑA-IGLESIAS, FRESNO y SHEPHERD, 1982) con lo cual hay otro potyvirus diferente que pertenece a la subdivisión III, aunque no lo hemos detectado en ningún ajo español.

Mediante el estudio de ordenación de las partículas en el citoplasma también podemos vislumbrar, en ocasiones, de qué virus se trata. Así (Fig. 35) identificamos como ya hemos expresado partículas de carlavirus en no muchas ocasiones.

Esta ordenación es característica de los carlavirus (WETTER y MILNE, 1981) y es diferente a la dispersa que presentan los potyvirus (Fig. 36).

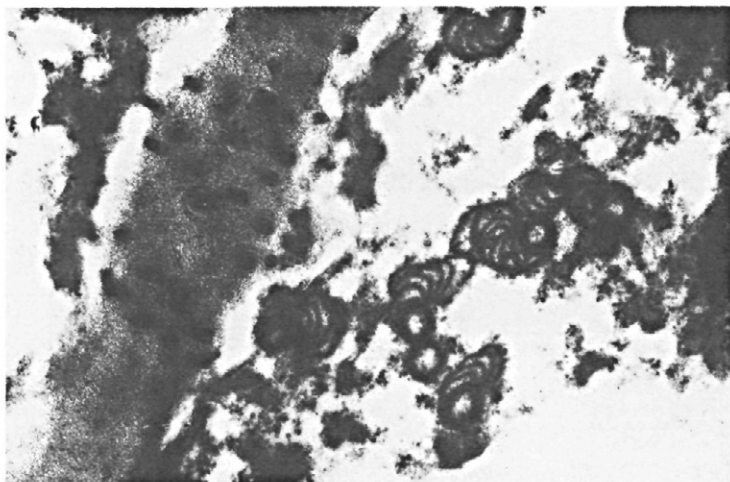


Fig. 32.—Pared celular con gran cantidad de plasmodesmos (en sección transversal). A la derecha puede verse un grupo de rosetas (pinwheels) con círculos que corresponden a secciones transversales de las inclusiones cilíndricas típicas de los potyvirus.

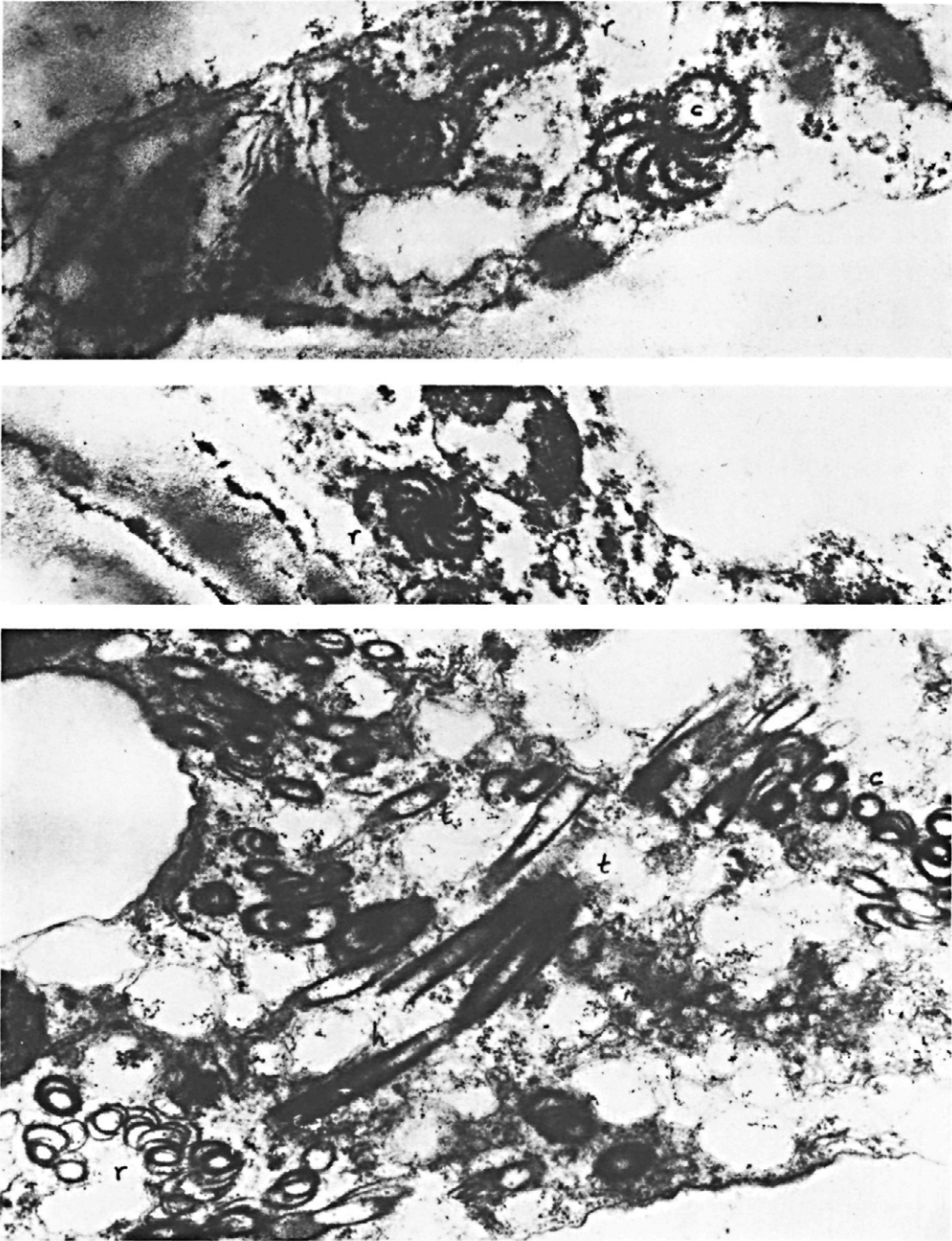


Fig. 33.—Rosetas con círculos observados en ultrasecciones de tejidos de ajos degenerados de Lanzarote. Roseta (pinwheel) sin círculos (scrolls) próxima a pared celular. Ajo de Las Pedroñeras. Rosetas (r), tubos (t), haces (h) en citoplasma de ajos viróticos de Las Pedroñeras. Estas características de las inclusiones cilíndricas clasifican al potyvirus en la subdivisión I de Edwardson.

Fig. 34.—Diversas secciones de inclusiones circulares. Rosetas (r), círculos (c), tubos (t) y haces (h). Estos grupos de inclusiones circulares debajo del núcleo (N) son comparables a la inclusión (ic) correspondiente a una microfotografía tomada al microscopio óptico.

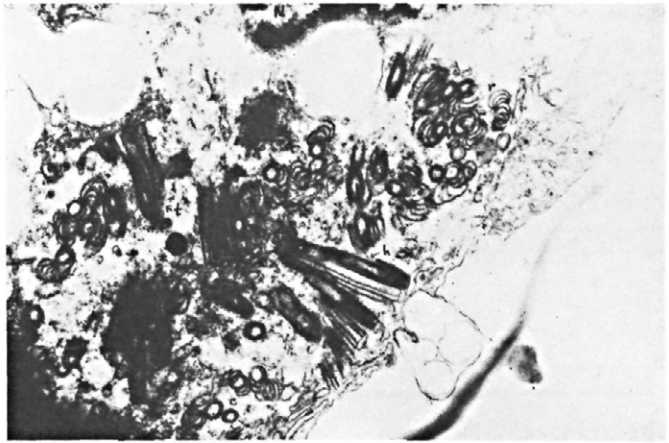


Fig. 35.—Agregado de partículas víricas con ordenación similar a la de los carlavirus encontrados con muy escasa frecuencia en ajos de Cuenca.

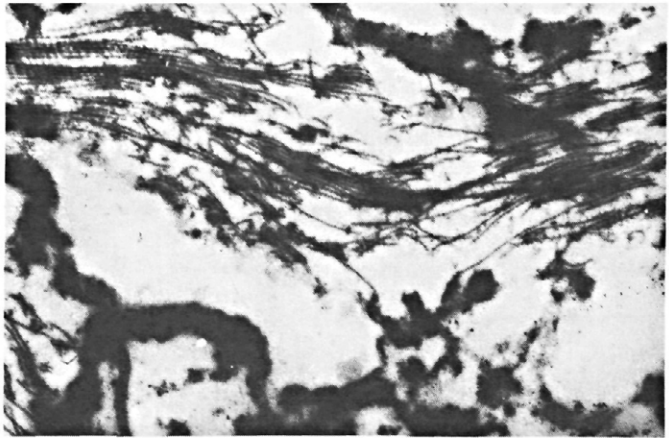
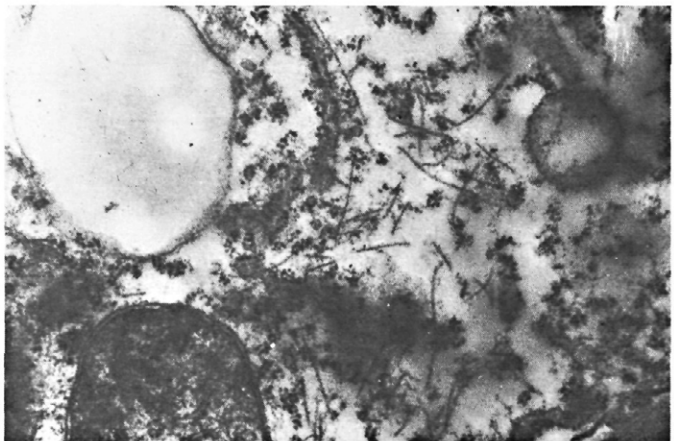


Fig. 36.—Partículas víricas dispersas en el citoplasma lo cual es característico de los potyvirus. Ajo de Las Pedroñeras.



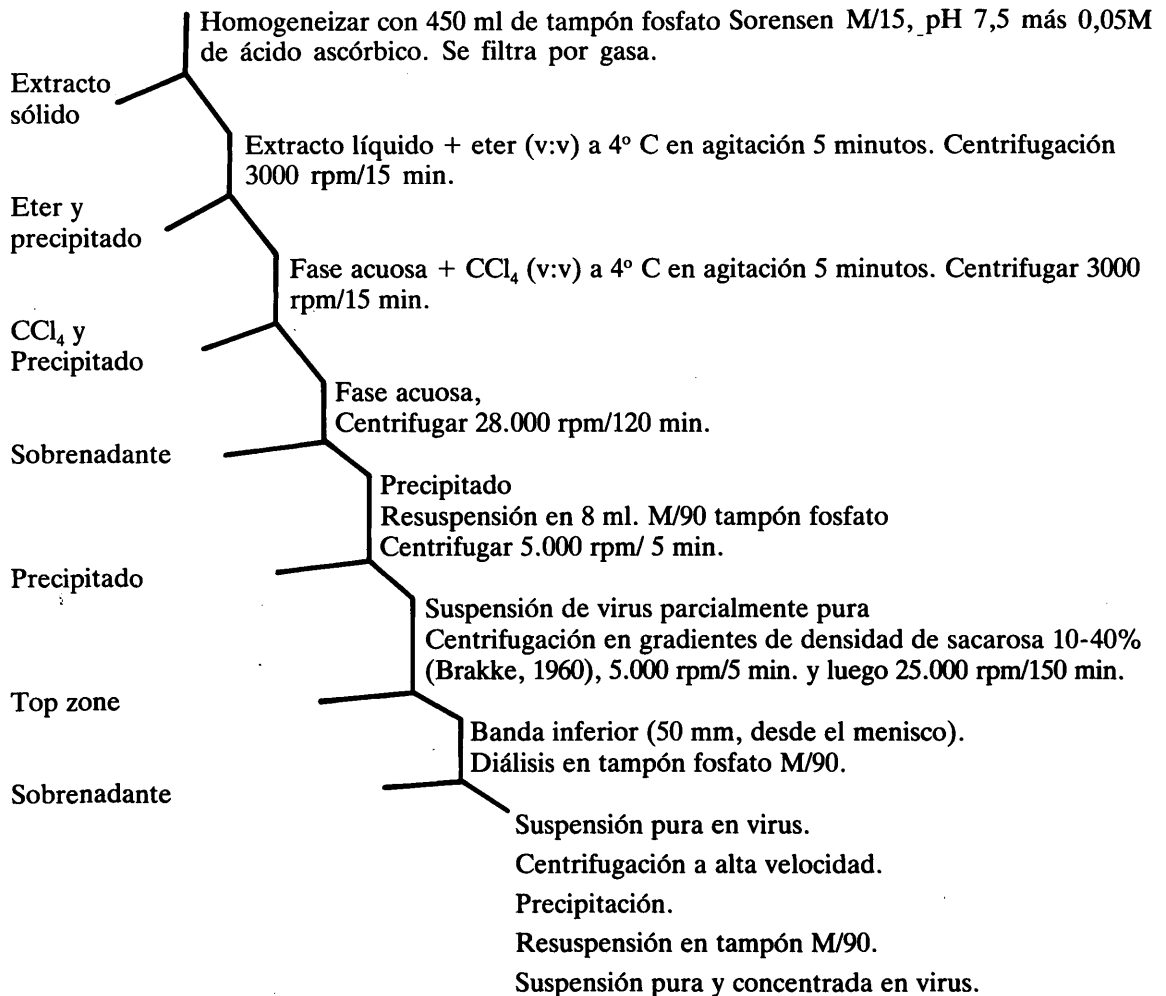
En relación a otros virus, Leek yellow stripe, que por vez primera en el mundo hemos identificado en ajo no podemos encuadrarlo claramente en la subdivisión I o III ya que no está claro (HORVAT y VERHOYEN, 1975) si produce agregados laminares o no. Más bien pensamos que pertenece a la subdivisión I. No obstante tenemos que estudiarlo o discutirlo con nuestro colega Michel Verhoyen.

Purificación y aislamiento de virus

El ajo contiene muchos mucílagos y pectinas que son difíciles de separar de los virus. Sin embargo nosotros utilizamos desde un principio un método que nos fue maravillosamente. El procedimiento (PEÑA-IGLESIAS, 1975; PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1983) lo presentamos para simplificar en forma de diagrama.

METODO DE PURIFICACION DE LOS VIRUS DEL AJO

Hojas de ajo infectadas 300 gr



Quizás añadir hemicelulosa al 1% en el primer tampón extractor fuera beneficioso. No obstante se han publicado algunos métodos que no mejoran este (DELECOLLE y LOT, 1981; HORVAT y VERHOYEN, 1975) ya que nuestros colaboradores los han ensayado y no han llegado a los resultados que, nosotros personalmente, llegamos antes.

Como puede verse en la Fig. 38 se formaron 2 bandas que contenían partículas 580×10 nm, de posiblemente carlavirus la superior y de potyvirus 712×12 nm la inferior. Este caso correspondió a una muestra de Salamanca que contenía los dos virus.

En general sólomente hemos visto una banda inferior (aparte la de proteínas de la planta situada arriba en el tubo) generalmente situada a 50 mm del menisco. Esta banda (Fig. 39) contiene los potyvirus, en estado puro. Como antes hemos dicho la utilizamos para preparar un antisuero, para inocular plantas sanas de meristemo y para estudiar su morfología.

Inmunomicroscopía electrónica.

Caracterización de los virus crónicos detectados que infectan ajos conquenses

Disponemos de los antisueros del virus Onion yellow dwarf (OYDV) adquiridos a Cultex (representante en España de Inotech) y otro (Bos, 1976) enviado por nuestro colega Dr. Lute Bos del Research Institute for Plant Protection (IPO, Wageningen, Holanda), de título 1/1.024.

Igualmente otro antisuero (de título 1/1.024) de un virus, recientemente identificado en Holanda y denominado Leek yellow stripe virus (LYSV) (BOS, HUISBERTS, HUTTINGA y MAAT, 1978; BOS, 1981). Tomando como antígeno (virus) extractos de hojas de plantas de ajo con síntomas de virus procedentes de la provincia de Cuenca, hemos practicado la técnica de inmunomicroscopía electrónica (ISEM), también llamada microscopía electrónica serológicamente específica (SSEM) o microscopía electrónica de inmunosorbentes, descrita por Derrick (1973) y mejorada y dis-

cutida posteriormente (MILNE y LUISONI, 1977; MILNE y LESEMANN, 1984). Concretamente la técnica aplicada ha sido la denominada ISEM-P, consistente básicamente en: 1) Emplear rejillas (400 mesh) con una película de formvar y de carbón, cubrir con una solución de proteína P. 2) Incubar $20 \mu\text{l}$ de antisuero (OYDV o LYSV antisueros) convenientemente diluidos (1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1.024). 3) Lavar. 4) Adherir el virus ($10 \mu\text{l}$ de jugo foliar clarificado) en la rejilla. 5) Lavar. 6) Teñir con acetato de uranilo al 2%. Secar. 7) Observar las rejillas al microscopio electrónico.

Nuestra sorpresa fue mayúscula. Los resultados fueron: a) Los anticuerpos del antisuero del potyvirus OYDV "decoran", es decir, rodean las partículas de un potyvirus de ajos de Cuenca pero no absolutamente, ya que hay partículas no "decoradas". b) Lo mismo ocurre (Fig. 40) con los anticuerpos del virus LYSV.

Las preparaciones testigo, es decir, sin la adhesión de ningún antisuero, permanecen sin decorar.

La explicación de lo anterior es que hay por lo menos dos potyvirus que infectan los ajos conquenses (esto es una primicia ya que pensábamos que sólo existía un potyvirus): Uno es el Onion yellow dwarf virus y el otro el Leek stripe virus o bien virus muy próximos serológicamente a los anteriores.

Repetimos este experimento de otra forma, mezclando los antisueros del OYDV y del LYSV a las diluciones mencionadas. Algunas partículas quedaron sin "decorar" lo cual hace sospechar que quizás haya otro potyvirus más. Será el potyvirus latente que se sospecha en Francia (DELECOLLE y LOT, 1981).

Esperamos intercambiar antisueros y muestras y profundizar más en este importante tema. No obstante es una primicia no publicada la identificación del Leek yellow stripe virus en ajo.

En un posterior estudio hemos comprobado que estos virus OYDV y LYSV están bastante extendidos, (Lanzarote, Salamanca, Zamora,



Fig. 37.—Rosetas con círculos y agregados laminares observadas en un ajo de la var. "California late" (equivalente a nuestro "Chinchón fino" enviada por el Prof. R.J. Shepherd de la Universidad de California (Davis). Este potyvirus pertenece a la Subdivisión III de Edwardson.

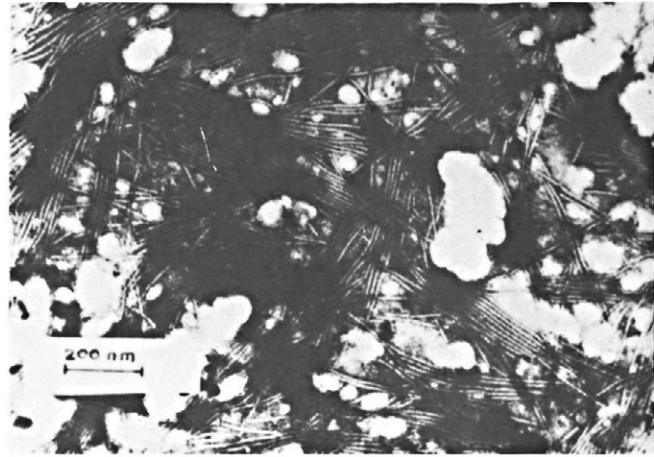


Fig. 39.—Microfotografía tomada en el microscopio electrónico o electrografía (término más lógico) de tinción negativa de una zona simple observada en gradientes de densidad de sacarosa ultracentrifugados. La zona es equivalente a la designada ZI de experimentos anteriores.

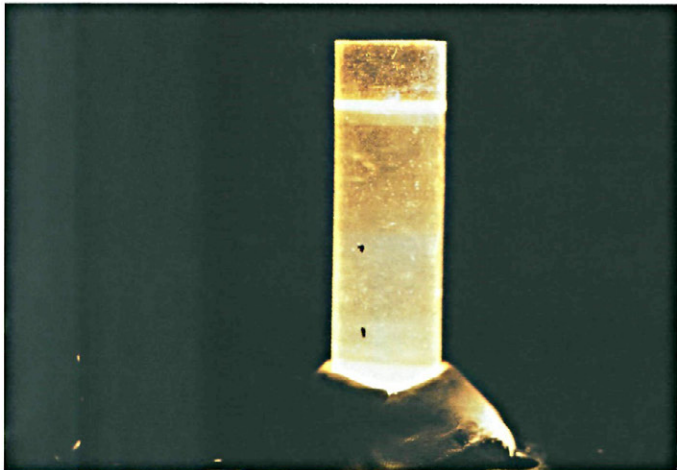


Fig. 38.—Gradiente de densidad de sacarosa 10 - 40%, al que se le añadió 1,5 ml de una suspensión purificada de virus de ajos, después de ultracentrifugación a alta velocidad, 27.000 rpm. Pueden observarse 2 bandas o zonas ZS y ZI que contienen partículas víricas.

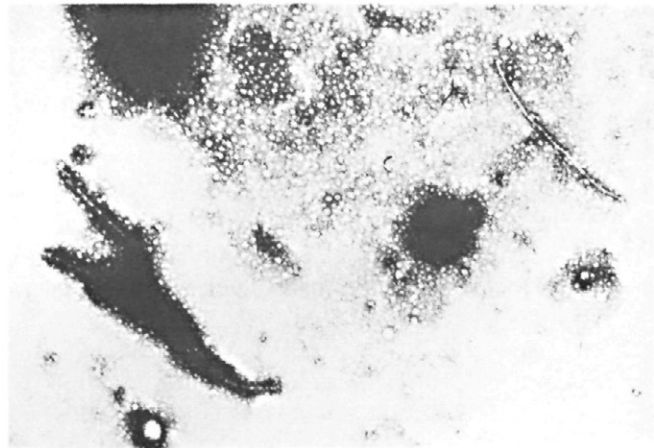


Fig. 40.—3 partículas de potyvirus de ajos de Cuenca fuertemente "decoradas" con anticuerpos de antígenos del virus Leek yellow stripe (LYS) con el cual lo identifica. Obsérvese una partícula sin decorar lo cual indica que hay otro potyvirus que pudiera ser el OYDV o incluso otro además. 72.000 x.

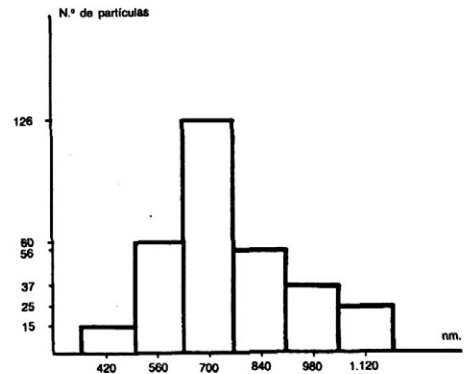
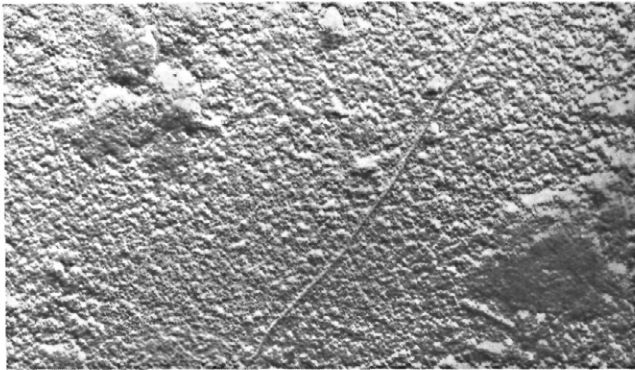


Fig. 41.—A) Partícula vírica de potyvirus de ajo de Las Pedroñeras sombreada con otro-paladio para calcular más exactamente sus dimensiones.

B) Histograma de partículas víricas de ajos de Las Pedroñeras. La longitud normal es 750×12 nm.

además de La Mancha). Como hemos estudiado por inmunomicroscopía electrónica el problema se aclara notablemente: Tenemos 3 potyvirus: OYDV, LYSV y otro no identificado que pudiera estar descrito (DELECOLLE y LOT, 1981). En este sentido estamos en vanguardia en el mundo.

REGENERACION SANITARIA

Todas las plantas de ajo que hemos diagnosticado en 18 años han resultado estar enfermas por, al menos, un virus que, al ser un potyvirus, pueden ser 2 ó 3 potyvirus diferentes como acabamos de ver. Por tanto, una selección sanitaria de plantas sin síntomas no conduce más que a elegir los mejores individuos y, si se aplican otros criterios como morfología y peso del bulbo, buen porte aéreo, elevado contenido en alicina, comprobación de resistencia o, al menos, de no excesiva susceptibilidad a otras plagas y enfermedades del ajo aparte de los virus, no es más que una selección clonal. De esta forma en el Centro de Capacitación y Experimentación Agraria de Las Pedroñeras (Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha) se está haciendo una selección clonal bastante meritoria pero que podría y debería mejorarse, introduciendo alguno de los factores, objeto de la selección,

mencionados. Para ello se necesitan más medios, equipo y personas. No obstante creemos que todo llegará y, poco a poco, se irá mejorando el sistema utilizado.

El método de regeneración sanitaria que nosotros deseamos consiste en poner a punto una técnica que no necesite casi ni comprobación de diagnóstico de exención de virus ni de mutaciones. Y a ello vamos encaminados.

No obstante, el cultivo de meristemos, por sí solo, suministra una sólo planta de la extracción, siembra y cultivo de un meristemo. Y esto es una delicada y lenta operación con la desventaja de, al final, disponer de muchas plantas diferentes. Para ello hemos pensado en procedimientos rápidos de multiplicación *in vivo* o *in vitro*. De esta forma podremos disponer de clones de variedades comerciales de ajo con las ventajas que ello conlleva (homogeneidad de cabezas, similares respuestas a climatología, etc.) aunque bien es cierto que el ideal es el empleo de varios clones y no de uno solo ya que el mejor clon podría resultar susceptible a un factor externo (climatológico, plagas o enfermedades, etc.) que pudiera aniquilar un cultivo en un momento dado. Con la utilización de cabezas policlonales se resolvería esto contando con las ventajas de la clonación. Aunque insistimos el futuro es ir seleccionando lo que realmente es mejor.

En nuestro caso y dado que todas las plantas de ajos diagosticadas de virus (más de 1500) estaban enfermas y así creemos que están todos los ajos españoles, empleamos para la extracción de meristemos dientes externos de aquellos ajos "superflor" de Cuenca morfológicamente perfectos. Así pensamos que al eliminar los virus, los bulbos que obtengamos del cultivo de sus meristemos, deberán ser también morfológicamente perfectos y de mejor calidad y peso.

Cuando haya selecciones clonales estamos dispuestos a sanearlas. De hecho vamos a hacerlo con 2 tipos de ajos seleccionados en Las Pedroñeras en el Centro antes mencionado.

Multiplicación rápida del ajo

En el campo el ajo se multiplica por dientes. Un diente da lugar a una planta portadora de un bulbo que contiene varios bulbillos (no bulbillos que son las yemecillas epígeas transformadas en órganos de multiplicación vegetativa que ocurren en las inflorescencias). Generalmente un bulbo tiene un mínimo de 10.

Usualmente el agricultor utiliza los dientes externos como simiente, señalando que se obtienen luego bulbos más homogéneos sin que conozcamos ningún trabajo que demuestre esta elección.

Para intentar una multiplicación mayor de 1:1 hemos aplicado el método de Everett (1954) que utilizó y emplea nuestra excelente colega Stone (PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1983) del Glasshouse Crop Research Institute (Inglaterra) para multiplicar rápidamente bulbos de la ornamental *Narcissus tazetta* cv. "Grand Soleil d'Or", y, como el narciso tiene un bulbo tunicado y el ajo un bulbo de bulbillos o dientes, parecía imposible aplicar este método.

La aplicación la hemos efectuado de la siguiente forma: Sometemos los dientes individualmente al frío artificial para romper la dormición de yemas latentes. Para ello un período de 1 mes a +4° C es suficiente. Después de este tratamiento efectuamos varios cortes en el diente forma sectorial (Fig. 42) para obtener 3 a 4 sectores que contengan cada uno parte de la base o disco caulinar. Luego cada sector lo cortamos o dividimos en 3 a 4 piezas con su pequeña parte de disco caulinar o parte

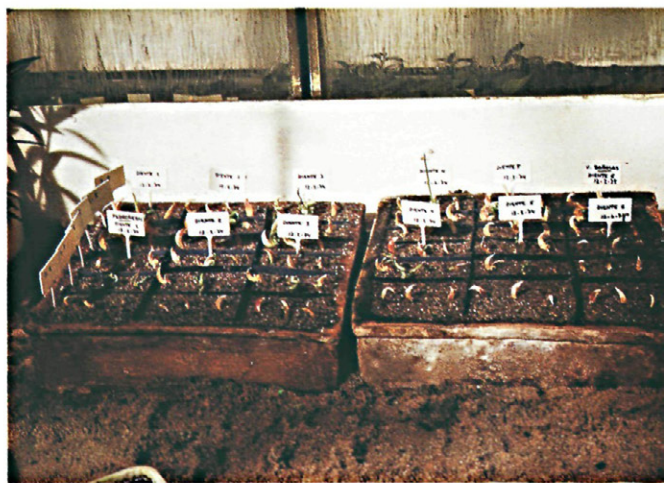


Fig. 42.—A) Multiplicación rápida del ajo. Corte de un diente de ajo. A la izquierda sectorialmente en 2 a 3 cortes para proporcionar 3 a 4 sectores. En el centro se ven los cortes laterales 2 a 3 para darnos 3 a 4 piezas, es decir, un total de 9 a 16 trozos de diente (con parte de disco basal) o "esquejes".

B) Multiplicación rápida del ajo. Se siembran en terrinas, con mezcla de tierra arenosa y calor de fondo y colocan bajo nebulización intermitente (mist system). A la semana se observan algunos esquejes brotados y enraizados.

basal. De esta forma tenemos de 9 a 16 piezas o "esquejes" a partir de un diente. Estos "esquejes" los plantamos en terrinas con mezcla esterilizada al vapor de tierra arenosa, como si fuesen dientes completos y colocamos estas terrinas o recipientes (Fig. 42) bajo nebulización intermitente con calor de fondo (mist system) de forma que proporcionemos a los esquejes un constante y elevado grado higrométrico ($\leq 95\%$) durante unos 15 días. Al cabo de 1 a 2 semanas (Fig. 43) podemos retirar las terrinas o disminuir la humedad relativa (nebulización). Posteriormente repicamos estas plantas a tiestos y evolucionan dando bulbos (a veces como si fuesen bulbillos). El porcentaje de plantas supervivientes ha oscilado entre 77 a 33% en numerosos experimentos, es decir, como cifra media mínima hemos obtenido 4 plantas de ajo a partir de un diente o, dicho de otro modo, de los 9 ó 16 esquejes plantados evolucionan, al menos, 4. En la Fig. 44 puede verse de abajo a arriba y de derecha a izquierda (abajo) y de izquierda a derecha (arriba) todo este proceso: los 12 esquejes y la evolución de uno de ellos en 2 semanas.

En España, desde un punto de vista de multiplicación, e incluso comercialmente, podría-



Fig. 43.—Multiplicación rápida del ajo. Véase a los 10 días de la plantación de los 16 "esquejes" de dos dientes. Hemos obtenido entre un 77% (máximo) y un 33% (mínimo) de plantitas desarrolladas a partir de estos "esquejes". En otras palabras, de un diente pueden obtenerse, al menos 4 plantas de ajo en lugar de una como es habitual.



Fig. 44.—Multiplicación rápida del ajo. Resumen del proceso explicado; De derecha a izquierda y de abajo a arriba. Esquejes ($12 = 3 \times 4$) de un diente y evolución de un esqueje en 2 a 3 semanas. Este proceso permitiría obtener millones de plantas (clon) de ajo tipificadas y sanas a partir de un diente de ajo sin virus.

mos tener 2 cosechas. Nos explicamos: El ajo se siembra en invierno: "Día que pasa de enero, día que pierde el ajero". Y se recoge en junio e incluso julio. Es curioso, en California: "Los ajos se siembran en junio o julio y se cosechan en septiembre. La comercialización se efectúa en enero". Estos son datos publicados: Internacional Fruit World 2-1986, p. 100 "Ajos durante 12 meses". De esta forma: ¿por qué no podría haber: Primer cultivo de noviembre-diciembre a junio y 1 mes de frío en frigorífico. Segundo cultivo: siembra en julio y cosecha en septiembre-octubre? Y esto último efectuado en invernadero en condiciones de protección de vectores, pulgones y/o ácaros (?), donde se efectúe la multiplicación. Así, de un meristemo obtenemos 1 bulbo con, al menos, 10 dientes seleccionados (cultivo normal). Multiplicación rápida: $4 \times 10 = 400$ bulbitos en septiembre-octubre. Segundo año: 400 bulbitos darán lugar a 400 bulbos. Factor de multiplicación: $4 \times 10 \times 400 = 16.000$. Tercer año: 16.000 darán lugar a 160.000. Factor de multiplicación $4 \times 160.000 = 640.000$ bulbos que proporcionarán 6.400.000 dientes, etc. Incluso podría haber dos cultivos de multiplicación (con dos factores de 4 por 6 meses).

El procedimiento de multiplicación es interesante pero preferimos otro, más controlado, ya que con este método, a veces, desafortunadamente, ocurren problemas de juvenilidad.

Cultivo de meristemas

En un laboratorio de cultivo *in vitro*, dedicado a la regeneración sanitaria, el objetivo final es lograr plantas sanas. De esta forma y basándonos en datos fisiológicos, antes expresados, extraemos meristemas cada día del año.

Los meristemas son un conjunto de células en activa división que al carecer de "puentes de unión" o plasmodesmos escapan a la infección vírica sistémica en la planta. Por tanto cuanto su extracción sea más perfecta la plan-

ta que genere tendrá más probabilidades de ser sana.

Para ello combinando las temperaturas $\leq 17^{\circ} \text{C}$ de conservación y $\leq 7^{\circ} \text{C}$ de rotura de la dormición, guardamos los dientes de los bulbos que vamos a sanear en dobles bolsas de polietileno perforadas ligeramente, y las introducimos bien etiquetadas en frigorífico ($+4^{\circ} \text{C}$). Al cabo de un mes aproximadamente estos dientes comenzarán a brotar y entonces plantamos en tiesto uno o dos para control de su contenido en virus. El resto son para extracción de meristemas.

Trabajamos en una sala de corte bajo cámara de flujo laminar estéril y utilizamos un bisturí o trozo de cuchilla de afeitar montando en mango especial metálico o de madera. Quitamos todas las hojas del diente (la protectora o papirácea y la de reserva que es el ajo propiamente dicho). Desinfectamos el brote por inmersión de 20 min. una solución de hipoclorito cálcico (12%) conteniendo unas gotas de Tween 20 (humectante) y lavamos 3 veces con agua destilada estéril. A continuación y bajo estereomicroscopio de 40 aumentos seguimos quitando hojas hasta descubrir la cúpula meristemática (Fig. 45). Extraemos, cuidadosamente, el meristemo (Fig. 45) con 1 a 2 primordios, es decir, 0,1 a 0,15 mm de longitud, el cual sembramos en un tubo de 10×100 mm sobre un medio nutritivo; todo tubo, tapón y medio esterilizados en autoclave a 110°C durante 30 minutos.

El medio de cultivo de meristemas que mejores resultados nos ha dado para el ajo contiene la mezcla de sales de Murashige & Skoog (MURASHIGE y SKOOG, 1962) o M & S, 3% de sacarosa, 0,4 mg/l de HCl de tiamina, 100 mg/l de i-Inositol, 0,01 mg/l de ácido naftaleno acético (ANA) y todo ello gelificado con 0,8% de agar de excelente calidad. Este medio se ajusta a pH 5,7.

Los tubos bien tapados en la cámara de flujo laminar, conteniendo los respectivos meristemas, se trasladan a una sala de cultivo *in vitro* con las siguientes condiciones: I Klx de iluminación especial para plantas (Gro lux, Fluor-

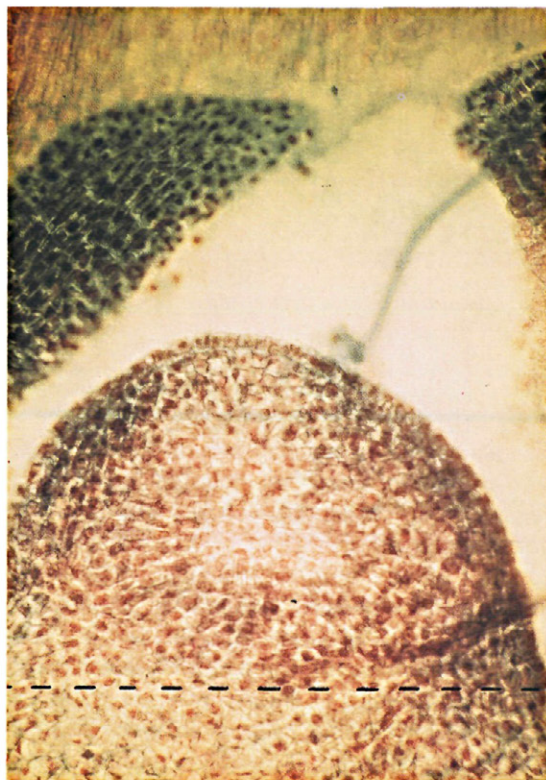
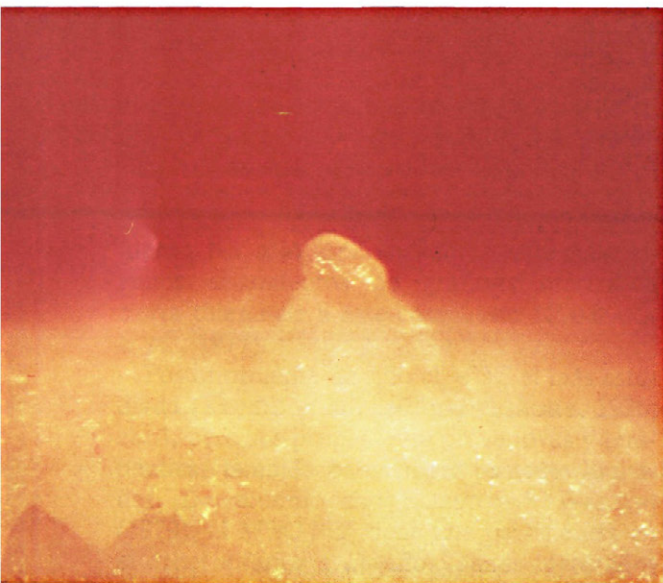


Fig. 45.—A) Cúpula meristemática reluciente que aparece al quitar las hojas protectora, de reserva y foliares de un diente brotando.

B) Sección de un meristemo mostrando la cúpula meristemática y 2 primordios foliares. La línea de puntos indica la porción que nosotros empleamos como meristemo apical.

ra o Plant Gro) durante 16 horas, con temperatura de 27° C y 60-70% de humedad relativa (HR).

Al mes aproximadamente comienza a apreciarse una pequeñísima mancha blanca (Figs. 46) y posteriormente se forma una plantita (Figs. 47, 48). Después de 1,5 a 2 meses se repican (transplantan) los brotes de 3 a 5 mm de longitud a nuevos tubos estériles de 15 × 150 mm conteniendo 4 ml del mismo medio. A los 4 a 6 meses, se forma un bulbito de unos 3 mm (Fig. 49). Cuando la parte aérea del brote está casi agostada (hojas amarillentas) colocamos los tubos en frigorífico a +4° C durante 1 mes. Al cabo de ese tiempo, bajo cámara de flujo laminar, sacamos el bulbito, que comien-

za a brotar y lo sembramos en tubos mayores, 25 × 150 mm, conteniendo 10 ml del mismo medio sin ANA. Después de otro ciclo vegetativo en la cámara de cultivo *in vitro* obtenemos un bulbo sin diferenciar de 1,5 a 2 cm. de diámetro.

En estas condiciones conseguimos un 80% de meristemos viables que se transforman (100%) en bulbitos.

Por este procedimiento, una vez transferido a tierra y cultivado en invernadero y al aire libre, conseguimos una media de plantas libres de virus de casi un 90%.

Así en 1982 entregamos al entonces CRIDA-11 (Canarias) ajos de Lanzarote que saneamos por cultivo de meristemos (Véanse

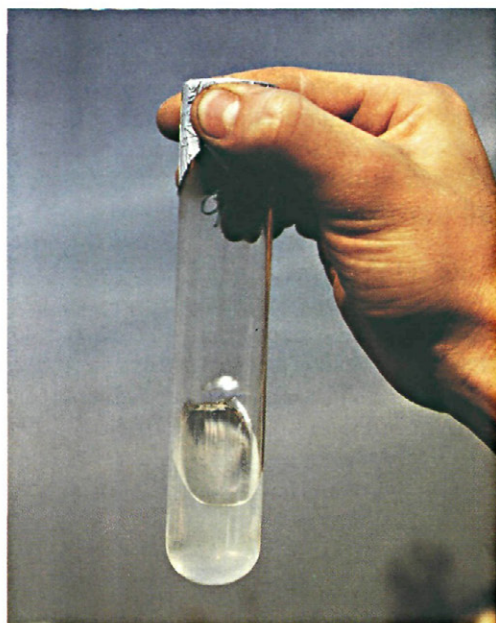


Fig. 46.—Evolución del meristemo (masa celular blanca) a los 40 días de su extracción y siembra *in vitro*.

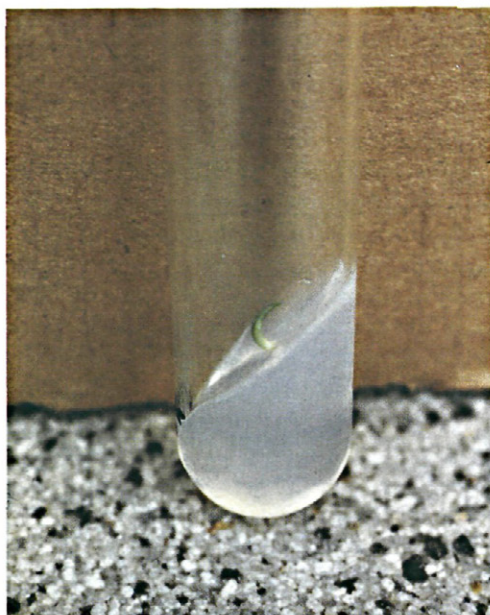


Fig. 47.—Brote procedente de un meristemo de ajo a los 55 días de su extracción y siembra *in vitro*.

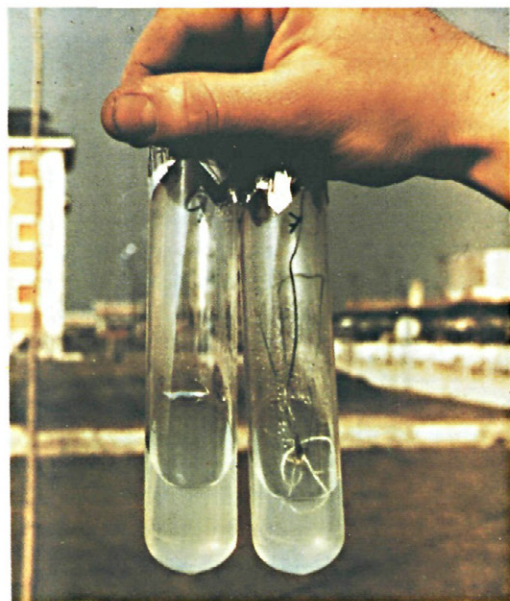


Fig. 48.—Cultivo de meristemos de ajo. En el tubo de la izquierda es casi imposible de apreciar el meristemo (0,1 a 0,2 mm) sembrado. A la derecha plantita de ajo procedente de la siembra de un meristemo a los 3 meses de ésta. Obsérvese que se ha iniciado la bulberización.

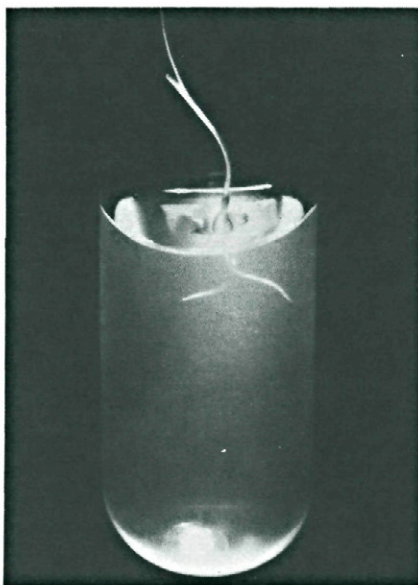


Fig. 49.—Bulbito formado *in vitro* a partir de una plantita de meristemo a los 4 meses de la siembra de ésta.



Fig. 50.—Una vez que la plantita ha terminado su ciclo vegetativo *in vitro*, colocamos el tubo que contiene el bulbo en frigorífico a temperatura 4 a 7° C durante 1 mes. Al mes repicamos a otro tubo mayor con medio fresco y a los 6 meses de cultivo logramos obtener un bulbo sin diferenciar todavía pero de un tamaño considerable (próximo a los 2 cm.).

cartas anejas). Igualmente disponemos de algunos ajos saneados del morado de Pedroñeras y esperamos sanear muchos más.

Termoterapia in vivo e *in vitro*

La extracción de meristemos de 0,1 a 0,15 mm no es una práctica fácil. Se requiere destreza, buen pulso y mucha paciencia. En este sentido es conocido el efecto de la termoterapia (HOLLING y STONE, 1968) o tratamiento por el calor, a 37° C que para muchas plantas inhibe la replicación vírica durante un tiempo variable para cada virus.

De esta forma pensamos con que un tratamiento previo de termoterapia sería posible efectuar no un cultivo *in vitro* de meristemos 0,1 a 0,15 mm sino un cultivo *in vitro* posterior al tratamiento de termoterapia de ápices vegetativos de mayor longitud. Para ello seguimos dos caminos, más o menos equivalentes.

Termoterapia *in vitro*: Para reducir en lo posible la contaminación bacteriana o fúngica *in vitro* difícilmente eliminable por desinfección de los dientes cultivados en mezcla de tierra (foco tremendo de microorganismos) ideamos el procedimiento que describimos: Tomamos los dientes en brotación que sembramos en los tiestos de una bandeja múltiple conteniendo una mezcla arenosa estéril (arena sola, arena con vermiculita, etc., pero sin tierra vegetal). Esta bandeja la colocamos en otra bandeja normal (Fig. 51) medio llena de una solución nutritiva de Knop. Estas bandejas las sometemos a un pretratamiento de termoterapia (30° C, 7 días) y después un mes a 37° C (Fig. 51). Esto nos ha permitido un resultado del 85% de plantas sanas al cultivar *in vitro* brotes diez veces mayores que los meristemos.

Termoterapia *in vitro*: Es una variante del método anterior. La diferencia es que los dientes los sembramos en medios de cultivo nutritivo gelificado, en sustratos inertes conteniendo soluciones nutritivas (Fig. 52) y de esta forma sometemos los respectivos tubos a los tratamientos de pretermoterapia y termoterapia, a veces con un sistema muy económico (PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1973), antes mencionados y posterior cultivo *in vitro* de brotes de 1 a 1,5 mm en condiciones asépticas. El inconveniente es que por este procedimiento la contaminación de microorganismos, que se desarrolla *in vitro*, es mucho mayor que por el procedimiento anterior, debido a la difícil desinfección de todo un diente.

En cualquier caso el inconveniente de este procedimiento es la difícil desinfección de la explanta o brote inicial del cultivo *in vitro*.

Micropropagación *in vitro*

Hace años observamos que en algunos cultivos se formaban no un bulbito sino alguno más (Fig. 53) a partir de la siembra *in vitro* de un meristemo.

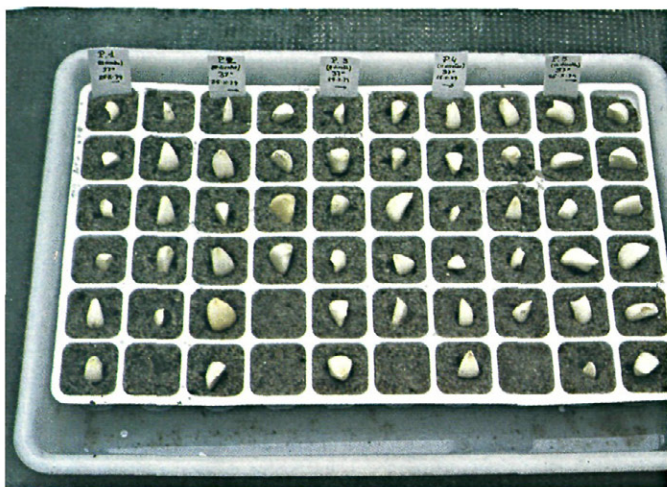


Fig. 51.—Termoterapia. A) Sembramos dientes de ajo en los tiestos de una bandeja múltiple conteniendo una mezcla muy arenosa estéril. Esta bandeja la colocamos sobre otra que contiene agua para que el riego sea por capilaridad. Las introducimos en cámara de termoterapia (37° C, 60-70% HR, 2 a 5.000 lux, foto período 12 horas). B) Brotes crecidos a temperatura que inhibe la replicación vírica al mes de su introducción en cámara de termoterapia. Esto permite utilizar, en lugar de meristemos, brotes crecidos en termoterapia de hasta 1 mm en lugar de 0,1 mm.



Fig. 52.—Termoterapia. Otro procedimiento que hemos utilizado consiste en la siembra de dientes *in vitro*. Y la extracción de ápices y puesta *in vitro* de éstos se hace después de someter los tubos con los dientes a un tratamiento de termoterapia de 1 mes aproximadamente.



Fig. 53.—Micropropagación *in vitro*. Primeros resultados en 1973. Puede observarse la formación de 6 bulbitos a partir de un meristemo.

La micropropagación de plantas fue desarrollada por varios autores. Murashige (MURASHIGE, 1974) estableció las tres fases de que consta: 1) Crecimiento; 2) Multiplicación; 3) Enraizamiento. Usualmente se utiliza un brote que crezca bien y no un meristemo. Nosotros en su aplicación al ajo empleamos un meristemo de 0,1 a 0,15 mm. El medio de crecimiento es igual al utilizado para cultivo de meristemas. Los tubos se colocan en la sala de cultivo *in vitro*. Cuando se forma un brote de unos 5 mm los transferimos a otros tubos conteniendo el mismo medio pero suplementado de 2-isopentil-adenina o 2-ip (1mg/l). De esta forma se forma una proliferación de brotes axilares y adventicios (Fig. 54). Separamos estos brotes en cámara de flujo laminar y sembramos uno de ellos en nuevos tubos conteniendo medio fresco en condiciones de máxi-



Fig. 54.—Micropropagación *in vitro*. Se ven 2 bulbitos delante y otros 2 detrás.

ma esterilidad y asepsia. De esta forma llegamos hasta obtener un número de brotes superior a 100 (Fig. 55). Recordemos que Bhojwani (BHOJWANI, 1980) obtenía un máximo de 8 cada mes y medio de subcultivo. Nosotros obtenemos un número variable entre 20 y 500 y como media 50. En nuestro caso al tener mejores resultados que Bhojwani es natural que tengamos más brotes axilares que adventicios (Fig. 56).

Posteriormente se transfieren individualmente estos brotes a otros tubos no conteniendo ANA ni 2-ip y así se facilita la bulberización (Fig. 54).

Este procedimiento felizmente no publicado (PEÑA-IGLESIAS, AYUSO y VILLEGAS, 1986) hace este trabajo inédito en este y en otros aspectos importantes ya mencionados. Es el que consideramos más idóneo para la regenera-



Fig. 55.—Micropropagación *in vitro*. Inducción de cientos de brotes (Bhojwani obtuvo un máximo de 8 brotes).

ción sanitaria de ajos. Se obtiene un 95% de plantas sanas igual que por el cultivo de meristemas expuesto. No obstante la diferencia es que por el primer procedimiento se logra un solo bulbo y por este se puede llegar a cientos de bulbos (clonación).

No hemos querido ni ensayar el procedimiento de micropropagación *in vitro* de brotes procedentes de células indiferenciadas de callos mediante citoquininas (ABO-EL-NIL, 1977; KEHR, SCHAEFFER, 1976) debido a lo que ya sabemos que ocurre con las mutaciones y degeneración de cultivos *in vitro* de estos brotes, para otras plantas y también comprobado en ajo (NOVAK, 1974, 1978 y 1980).



Fig. 56.—Vista de cerca de un tubo similar a los anteriores. Pueden notarse que son brotes axilares (así en otras plantas no se producen mutaciones) y no proliferaciones de brotes adventicios procedentes de la diferenciación de células de un callo (lo cual en otras plantas induce mutaciones). En el trabajo de Bhojwani se forma callo con lo cual tiene un elevado riesgo de obtener mutantes.

Utilización de virustáticos

Nuestra idea y deseo es poner a punto un método de micropropagación *in vitro* que permita a partir de un meristemo obtener el máximo número de bulbos posible que, conservando el mismo genotipo y fenotipo que el bulbo a que pertenecía el diente del que extrajimos el meristemo, estén exentos de virus sin necesidad de comprobación de laboratorio.

Para ello estamos ensayando sustancias virustáticas (TOMLINSON, 1982), como la ribavirina (de nombre comercial virazol) que adicionado al medio de cultivo frena la replicación vírica y así poder extraer meristemas con mayor garantía de sanidad respecto a virus.

Para ello estamos ensayando otros virustáticos y en diversos momentos de crecimientos *in vitro*.

Establecimiento en tierra

Este es un capítulo importante debido a que el primer bulbito que se origina a partir de un cultivo de meristemas necesita cultivarse, al menos, 3 años al aire libre para proporcionar una cabeza adulta o comercial o bien diferenciada anatómicamente (MANN, 1952).

Ocurre que si se trasplanta a tierra plantitas con el primer bulbito que se forma se obtiene un porcentaje de pérdidas, a veces considerable, dependiendo de la higrometría que existe en torno al tiesto donde se repique. La elevada higrometría (100%) que la plantita tiene dentro del tubo no podrá nunca igualarse a la del exterior aun con los más sofisticados procedimientos. Por ello nosotros efectuamos el segundo ciclo mencionado (ver cultivo de meristemas). Con el bulbito de mayor tamaño 1,5 a 2 cm después de agostado y rota la dormición en frigorífico no tenemos una sola pérdida. Así una vez brotado lo cultivamos en tierra y en invernadero (Figs. 57 y 58) en condiciones de ausencia de plagas y enfermedades

(mezcla estéril, tratamientos fitosanitarios, invernadero con malla antipulgón). De ahí a cultivo al aire libre en estructuras metálicas (jaulones) con tela metálica de malla que impide el acceso de pulgones vectores a su interior (Figs. 59, 60).

De esta forma hemos obtenido clones de ajos de excelente aspecto (Fig. 61) en los que hemos comprobado su exención de virus y que mantienen el fenotipo del ajo morado conense.

Verificación de la exención de virus y mutaciones

Diagnósticos víricos

Los hemos efectuado hasta ahora por microscopía electrónica (tinciones negativas) y

observación de existencia o no de partículas víricas.

Una vez obtengamos un antisuero (polivalente) policlonal los métodos más sensibles son los experimentados por nosotros: ELISA e ISEM-P.

Hasta ahora hemos efectuado tinciones negativas en todas las fases, especialmente en invernadero y al aire libre.

Nuestra próxima comprobación en estudio comparativo no puntual será verificar si todas las plantas de un clon procedente de un meristemo están sanas o no pues esto facilitaría enormemente el diagnóstico.

La exención de virus la hemos comprobado en algún caso por el estudio de la ultraestructura celular de hojas de ajos procedentes de cultivo de meristemos (Fig. 62).

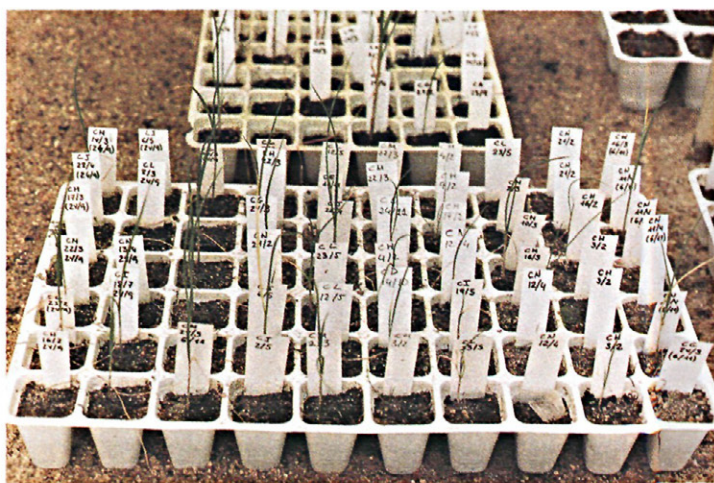


Fig. 57.—Establecimiento en tierra. A) Siembra en arena estéril. B) Siembra en mezcla de tierra estéril de bulbillos procedentes de meristemos y cultivados *in vitro*.



Fig. 59.—Cultivo al aire libre al abrigo de contaminaciones víricas.

- A) Jaulón con tela metálica muy fina que lo hace inaccesible a los pulgones. Tierra desinfectada con DD. En su interior efectuamos la multiplicación de ajos sanos.
 B) Siembra bajo jaulón antipulgón. Detalle de su interior.
 C) Detalle de plantita de meristemo (clon) brotando.



Fig. 60.—Detalle de clones de plantas regeneradas sanitariamente por cultivo de meristemos y micropropagación de éstos. Obsérvese porte erecto y color verde uniforme.



Fig. 61.—A) Recogida de clones de ajos (bulbos) de Las Pedroñeras regenerados por cultivo de meristemos y micropropagación y exentos de virus.
B) Detalle de bulbos y dientes sanos.

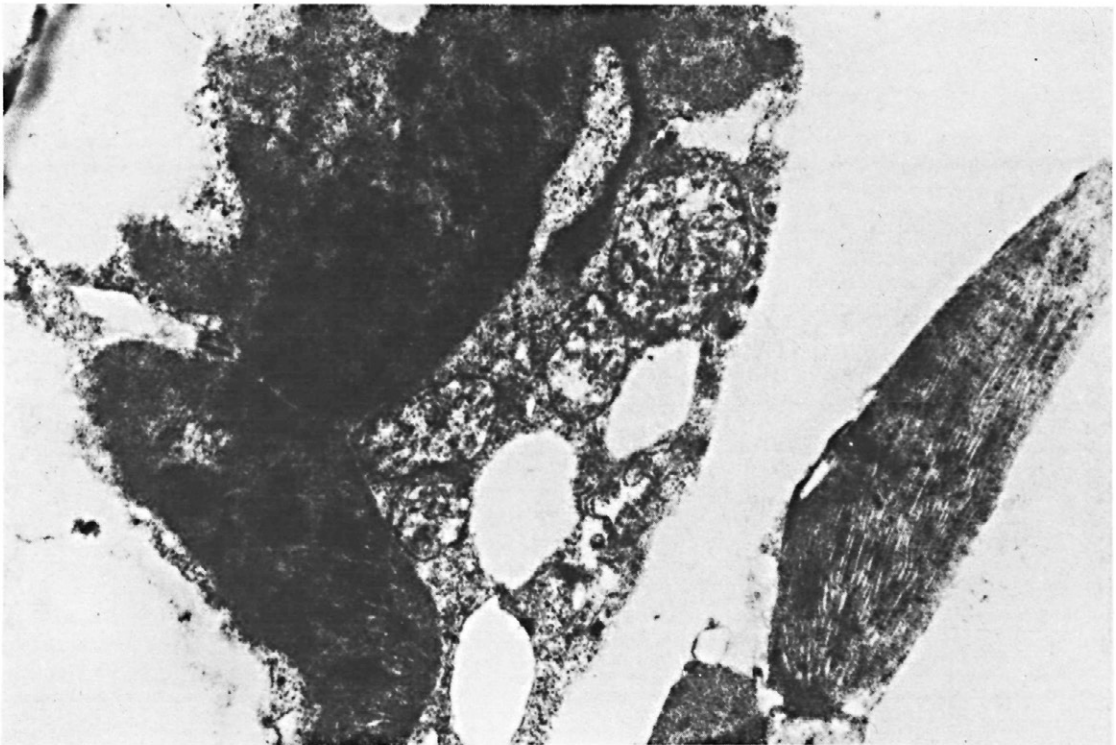


Fig. 62.—Ultrasección de tejido regenerado sanitariamente. Aquí no hay inclusiones cilíndricas ni partículas víricas.

Verificación de la estabilidad genética

Hemos efectuado el recuento cromosómico tanto de ajos antes del cultivo de meristemos como después de efectuado éste y su cultivo correspondiente para detectar alguna posible anomalía tanto cuantitativa como morfológica.

El recuento morfológico se efectuó median-
te:

a) Observación de metafases de mitosis en vista polar cuando se trata de cortes al micro-
tomo.

b) Observación de metafases de mitosis después de disociarse, cuando se trata de material aplastado.

El material empleado, en uno y otro caso, ha sido raíces de ajo en pleno crecimiento ya que en éstas es donde hay una célula en división.

El método seguido ha sido el de Feulgen:

(1) Pretratamiento: con 8-oxiquinoleína al 0,002M. Se deja el material 3 horas en tubo abierto. (2) Fijación: con Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) 10 horas en el material en tubo cerrado. (3) Lavado: con agua destilada durante 3 minutos. (4) Hidrólisis: con HCl 1N a temperatura de 60° C durante o más de 12 minutos. (5) Lavado: 2 veces en agua destilada durante 1 minuto por vez. (6) Tinción: con fuchsina diamante dejando las muestras 30 minutos como mínimo en tubo tapado y en oscuridad. (7) Montaje: las raicillas deben aparecer en zonas teñidas de color violeta intenso. Estas zonas teñidas se colocan en un porta y se les añade 1 gota de ácido acético (45%). Se cubren, con cuidado de que no quede aire previo, machacando con lápiz-goma. Se presiona y así están listas para observación al microscopio óptico.

Tanto en las preparaciones de plantitas con virus como de las regeneradas por cultivo de meristemos e incluso de las micropropagadas se observaron los 16 cromosomas de esta especie y ninguna anomalía morfológica. Es decir, los ajos procedentes de cultivo de meriste-

mos son fenotípica y genotípicamente iguales a los enfermos cultivados. Indiscutiblemente se aprecia una mejor morfología de sus cabezas y un porte más erecto (sin retorcimiento de hojas) y color verde uniforme en los ajos de meristemos.

Multiplicación de ajos regenerados al abrigo de contaminaciones posteriores

Además de lo expresado en "Establecimiento en tierra" debemos pensar en una normativa para la multiplicación de las cabezas de ajo regeneradas por cultivo de meristemos, llamémosles ajos mericlónicos (en otras plantas este término se expresa en inglés "mericlon" de la abreviatura *meristem clon*).

De momento y basándonos en nuestra experiencia, en la recogida en la literatura y en nuestras discusiones con colegas de otros países, recomendamos la reproducción de estos ajos en alturas superiores a los 1000 m donde ocurre la casi ausencia de pulgones alados.

Debe tenerse excesivo cuidado en evitar la infestación de ácaros por lo expuesto (AHMED y BENIGNO, 1985; TAHEREMUSHKINE, 1974; TULEGENEV, 1972) en su papel como posibles vectores. Y eliminar todo posible foco de virus dentro del cultivo.

Por ello es muy importante la prevención sanitaria de los bulbos a conservar, antes expuesta, con una pasta acaricida-fungicida es interesante así como la inmersión de 12 horas en agua fría seguida por un tratamiento de agua caliente (48-49° C) conteniendo 10% de formaldehído y secado 48 horas en aire caliente que elimina larvas, huevos de insectos y hongos (según los franceses).

Respecto a la distancia a cualquier otro cultivo de Liliáceas (especialmente ajos) se recomiendan 20 km de alejamiento (MOHAMED y YOUNG, 1981).

Siempre es recomendable la escarda química en un cinturón de la parcela de multiplicación lo más amplio posible, especialmente de Liliáceas silvestres.

Muchas prácticas de cultivo (HARPAZ, 1982) serán recomendables en su día, al agricultor cuando utilice "simiente" selecta y sin virus. Quizás fuera interesante ensayar pulverizaciones de aceites con pirimicarb o piretrinas (ASJES, 1985) para comprobar si este procedimiento no perjudica la calidad del ajo y si no es tóxico a las plantas como recomendación al agricultor para mantener su cultivo lo más limpio posible de virus.

DISCUSION: SITUACION ACTUAL Y FUTURA

Situación actual: Hemos comprobado por varios métodos que todos los ajos españoles (Aja, Bañolas, Chinchón basto o ajo blanco de Córdoba, Chinchón fino, Lanzarote, Mallorquín, Morado de Pedroñeras, Salamanca) están crónicamente infectados por uno o varios potyvirus. Concretamente los ajos de Cuenca están infectados por los virus OYDV u "Onion yellow dwarf" (virus del raquitismo amarillo de la cebolla) y "Leek yellow stripe" o LYSV (virus del rayado amarillo del puerro), además de, ocasionalmente, por un carlavirus o virus "carla". En otras variedades comerciales también hemos detectado un virus esférico que no hemos identificado todavía ya que es muy raro encontrarlo. Hemos puesto a punto un método que aísla y purifica los potyvirus (en su conjunto) y los carlavirus.

Se han puesto a punto técnicas de identificación de virus rápidas como el estudio de efectos citopáticos de los potyvirus en ajo que es sencillo, rápido y económico (AYUSO, PEÑA-IGLESIAS, 1980), y puede practicarla cualquier persona con un mínimo de aprendizaje. De igual modo técnicas de identificación rápida por microscopía electrónica o incluso más específicas como la inmunomicroscopía electrónica (ISEM-P). También técnicas de detección masiva de virus (ELISA) aplicadas al virus OYDV.

Hemos descrito fisiopatías que aclararán conceptos a agricultores, técnicos e investigadores.

Está claro que los virus identificados, especialmente los potyvirus, provocan una degeneración de las plantas de ajo que se traduce en un estriado clorótico con tonalidades amarillas de diferente intensidad, a veces, acompañado de rizamiento de hojas y un raquitismo de la planta más o menos acusado. Sin embargo el efecto más directo y negativo es la disminución de peso que puede llegar a alcanzar una reducción hasta del 75% (BHOJWANI, 1980; BHOJWANI, COHEN y FRY, 1982; MESSIAEN y ARNOUX, 1960; MESSIAEN, YUCEF-BENKADA y BEYRIES, 1981; MOHAMED y YOUNG, 1981; PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1983; PRADEL, 1979; YUCEF, 1980) o, incluso, hacerlo incomercializable. Que plantas de apariencia normal (aunque es necesario buscar bien la estriación clorótico-amarillenta) estén infectadas por potyvirus, como hemos comprobado en miles de casos e incluso produzcan un año una cabeza "Superflor", es un hecho inexplicable para el no especialista. Sin embargo puede ocurrir: 1) que el grado de infección no llegue a producir efectos en el bulbo. 2) que tenga un tipo de infección latente por un virus "poty" y no lo esté, o lo esté en poco porcentaje, por otro u otros virus "poty" diferentes (hemos detectado 3 distintos).

Está, por tanto, fuera de toda duda que hay que sanear o regenerar sanitariamente los ajos de Cuenca, como debería también hacerse con el resto de los autóctonos españoles. También es evidente que hay que seleccionar clones con buen aspecto, óptimo rendimiento, cabezas de morfología perfecta, alto contenido en alicina, escasa producción de bisulfuro o tiosulfuro de alilo (olor de aliento a ajos) aun cuando convendría estudiar si este factor está ligado con el anterior (alicina) y excelente sapidéz. No obstante nosotros creemos que lo anterior no lo puede hacer un seleccionador por sí solo o al menos no es capaz de mantenerlo sin una regeneración sanitaria y reproducción controlada.

En su día y ante la inexistencia de tales clones partimos de cabezas de morfología lo más perfecta posible y tamaño "superflor". Así he-

mos micropagado *in vitro* brotes procedentes del cultivo de meristemos que han proporcionado bastantes plantas sanas con un índice de regeneración sanitaria bastante elevado (90-95%) cuando el tamaño del explanto es de 0,10 a 0,15 mm. Hemos comprobado que las plantas así obtenidas no presentaban diferencias fenotípicas ni alteraciones cromosómicas. **Recientemente hemos entregado a la Excm. Diputación Provincial de Cuenca 5000 elementos de multiplicación regenerados.**

El cultivo de meristemos de ajos tiene el inconveniente de que las plantas retornan a su aspecto juvenil o tienen "juvenilidad" (AYUSO y PEÑA-IGLESIAS, 1980, 1981; HWANG, AN y CHOI, 1984; MAGGIONI, 1984; MARANI y BERTACCINI, 1980; MIKAMI, 1984; PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1974; PEÑA-IGLESIAS, 1975; PEÑA-IGLESIAS y AYUSO, 1983; QUIOT, MARROU y LEROUX, 1972) que es un hecho similar al que ocurre en algunas plantas reproducidas por semillas que son "juveniles" hasta después de varios cultivos. En ajo se "rompe" la juvenilidad a los 4 años de cultivo. Nosotros lo hemos reducido a 2 años (AYUSO y PEÑA-IGLESIAS, 1981) aplicando las condiciones óptimas de temperatura y fotoperíodo en cultivo *in vitro* a las plantitas en fase de crecimiento, en fase de bulberización y en fase de agostamiento.

En definitiva nuestra metodología alcanza más de 50 brotes por subcultivo mientras que en investigaciones del extranjero (BHOJWANI, 1980) sólo se llegaba a 8. No produce mutantes sino plantas genéticamente estables.

Situación futura. Aunque parece todo he-

cho quedan algunos cabos por atar. Hay que aislar y purificar los potyvirus que hemos detectado. También otros virus como el "carla" y el esférico. Se deben preparar antisueros específicos de estos virus aislados o en su defecto, y ante la eventual dificultad de "separar" los potyvirus (HOLLING y BRUNT, 1981), preparar un antisuero polivalente de todos estos virus. De esta forma y ampliando la puesta a punto del estudio de los efectos citopáticos a los virus "carla" y esférico disponer de técnicas que detecten todos los virus que infectan los ajos españoles. E incluso poner a punto otras técnicas más modernas y sensibles (GRADDON y RANGLES, 1986) que ELISA.

No obstante, deseamos perfeccionar nuestro método de micropropagación *in vitro* de brotes procedentes de cultivo de meristemos mediante diferentes posibilidades de forma que podamos tener clones exentos de virus, con una posibilidad próxima al 100% y con un gran número de plantas por cada clon.

Sin embargo los métodos de diagnóstico servirán para comprobación del estado sanitario y de la bondad del método de regeneración, y para control de reinfecciones en el campo de las multiplicaciones sucesivas, las cuales aconsejaremos según nuestra experiencia.

Estamos absolutamente seguros que alcanzando los objetivos expuestos conseguiremos una elevación de calidad y especialmente del actual y pobre rendimiento del ajo (hoy de 55 Qm/Ha) hasta duplicarlo o triplicarlo como de hecho ha ocurrido en Francia y USA.

ABSTRACT

PEÑA-IGLESIAS, A., 1988: El ajo: virosis, fisiopatías y selección clonal y sanitaria. II Parte científico-experimental. *Bol. San. Veg. Plagas* 14 (4): 493-533.

This paper summarizes the works published up to now on virus and virus-like diseases of garlic, and the methods of virus elimination. As well in the first part the botanical and physiological characteristics, its economical importance and the problems found in Spain are analyzed. This paper also deals with the description of virus diseases and methods of sanitation of this important species. Our works on virus diseases identification, shoot apex culture, micropropagation, quimioterapy and sanitary selection along 23 years are described.

Key words: *Garlic, viruses, virus diseases, virus-like diseases, sanitation, sanitary selection, shoot apex culture, micropropagation, in vitro culture.*

REFERENCIAS

- ABIKO, K., WATANABE, Y. & NISHI, Y., 1980: Studies on garlic mosaic. I causal virus. *Bull. Veg. Orn. Crop. Res. Stn. Ser. A.* 7: 139-148.
- ABIKO, K., WATANABE, Y. & NISHI, Y., 1980: Studies on garlic mosaic. II. several factors affecting the detection of garlic mosaic virus following juice inoculation. *Bull. Veg. Orn. Crop. Res. Stn. A.* 7: 149-154.
- ABO-EL-NIL, M.M., 1977: Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic. *Plant. Sci. Lett.*, 9: 259-264.
- AHLAWAT, Y.S., 1974: A mosaic disease of garlic in Darjeeling. Hills. *Science and Culture*, 40: 466-467.
- AHMED, K.M., & BENIGNO, D.A., 1985: Investigation into the relationship of the eriophyid mite (*Aceria tulipae* Keifer) with the tangle-top and mosaic disease of garlic. *Bangladesh J. Agric. Res.*, 9: 1:38-47.
- ANON., 1973: Production de semences d'ail certifiées agréées CTIFL documents núm. 39.
- ANON., 1980: Aulx garlic (Revision). Normalisation Internationale des fruits et légumes. OCDE. París.
- ANON., 1982: Gilroy garlic capital of the World, *Int. Fruit World* 3: 137-143.
- ANON., 1984: The European Community importing more garlic, exporting less. *Int. Fruit World*, 3: 245-252.
- ANON., 1984: A century crop for spanish garlic. *Int. Fruit World*, 3: 361-367.
- ANON., 1985: Control of field spread of non persistent viruses in flower bulb crops by synthetic pyrethroid and pirimicarb insecticides and mineral oils. *Crop Protection* 4: 485-493.
- ASTLEY, D., INNES, N.L., & VAN DER MEER, Q.P., 1982: Genetic resources of *Allium* species, a global report. *Inter. Board. Plant. Gen. Res.* 81/77: 38 p.
- AYUSO, P., and PEÑA-IGLESIAS, A., 1980: Methodology for the elimination of pathogens in Spanish garlic. *In vitro*, 16:3: 233.
- AYUSO, P., and PEÑA-IGLESIAS, A., 1981: The elimination of garlic viruses by thermotherapy and/or tissue culture. *Cell Biology*, IR, 5:9: 831.
- BHOJWANI, 1980: In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. *Scientia Horticulture*, 13: 47-52.
- BHOJWANI, S.S., COHEN, D., & FRY, P.R., 1982: Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. *Sci. Hort.*, 18:1: 39-43.
- BONIER, G., 1934: Flore complete illustrée en couleurs de France, Suisse et Belgique, 79-80.
- BOS, L., 1976: Onion yellow dwarf virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. N, 158, 4 p.
- BOS, L., HUIJEBERTS, N., HUTTINGA, H., & MAAT, D.Z., 1978: Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus: characterization, ecology and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84: 185-204.
- BOS, L., HUTTINGA, H., MAAT, D.Z., 1978: Shallot latent virus, a new carlavirus. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84: 227-237.
- BOS, L., 1981: Leek yellow stripe virus CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 240. 4p.
- BOS, L., 1982: Shallot latent virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No. 250. 4p.
- BOS, L., 1982: Viruses and virus disease of *Allium* sp. *Acta Horticulturae*, 127: 11-29.
- BOTTI, G.C., & KRARUP, H.C., 1976: Morphogenesis of flowering and abnormalities in garlic. *Simiente*, 46:1: 23-25.
- BOTTI, G.C., & KRARUP, H.C., 1976: Morfogénesis de la floración y ciertas anomalías en el desarrollo del ajo cv. Valenciano rosado. *Investigación agrícola* (Chile), 4:1: 1-6.
- BRCAK, J., 1985: Garlic mosaic virus particles and virus infections of some wild *Allium* sp. *Och. Rostl.*, 11: 242.
- BRIERLEY, P., & SMITH, F.F., 1946: Reactions of onion varieties to yellow dwarf virus and three similar isolated from shallot, garlic and narcissus. *Phytopathology*, 36: 292-296.
- CADILHAC, B., QUIOT, J.B., MARROU, J., LERONX, J.P., 1976: Mise en évidence au microscope électronique de deux virus différents infectant l'ail et l'échalote. *Ann. Phytopathol.*, 8: 65-72.
- CHADUAT, L., 1983: Formation de fleurs a partir de cals chez l'ail. *Bull. Soc. Bot. France. Lettres botaniques*, 130:1: 65-72.
- CHEN, M.J., & KO, N.J., 1979: Etiological studies on virus diseases of garlic in Taiwan. *Plant Prot. Bull.*, 21: 210-215.
- CHRISTIE R.G., & EDWARDSON, J.R., 1977: Light and electron microscopic of plant virus infections. *Fla. Agric. Exp. Sta. Monograph*. No. 9.
- CHRISTIE, R.G., & EDWARDSON, J.R., 1986: Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Dis.*, 4: 273-279.
- CLARK, M.F., & ADAMS, A.M., 1977: Characteristics of the microplate method of ELISA for the detection of plant virus. *J. gen. Virol.*, 33: 166-167.
- CLARK, M.F., & BAR-JOSEPH, M., 1984: Enzyme immunosorbent assays in Plant Virology. In: *Methods in Virology* (Ed. K. Maramonosh & H. Koprowski). Vol. VII, pp. 51-85. Academic Press.
- D'AMATO, F., 1978: Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Ed. T.A. Thorpe). I.A.P.T.C. Calgary University Press, Canada, 287-295.
- DAWSON, W.O., 1984: Effects of animal antiviral chemical on plant viruses. *Phytopathology*, 74: 211-213.
- DELECOLLE, B., and LOT, H., 1979: Use of immunological electron microscopy to identify viruses in garlic seeds. *Ann. Phytopathol.*, II:4: 565.
- DELECOLLE, B., and LOT, H., 1981: Viroses de l'ail. I. Mise en évidence et essais de caractérisation par immunoelectromicroscopie d'un complexe de trois virus chez différentes populations d'ail atteintes de mosaïque. *Agronomie*, 1(9), 763-770.
- DERRICK, K.S., 1973: Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. *Virology*, 56: 652-653.
- DRAKE, C.J., TATE, H.D., & HARRIS, H.M., 1933: The relationship of aphids to the transmission of yellow dwarf of onion. *J. econ. Entom.*, 26: 841-846.
- EDWARDSON, J.R., 1966: Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cells infected with rod-shaped viruses. *Amer. J. Bot.*, 53: 259-364.
- EDWARDSON, J.R., 1974: Some properties of the Potato Virus-y-Group. *Fla Agric. Exp. Sta. Monograph Series* No. 4.
- EL-BAZ, S.A., 1985: Some studies on the production of healthy and high quality garlic seeds. *Agric. Res. Reviev* (Egypt), 59:3: 237-253.
- EMILSON, B., 1949: Studies on the rest period and dormant period in the potato tuber. *Acta agr. Suecana*, 3:3: 189-284.

- EVERETT, T.H., 1954: The American gardener's book of bulbs. New York, *Random House Inc.*
- FISCHER, H., 1975: An uncommon virus isolated from garlic in Morocco. *Abstr. 2nd Int. Conf. Prog. Probl. Veg. Virus Res.* Avignon, 28.
- FOGHER, C., & CORTI, C., 1982: Protoplast production and characterization from leaves and cloves of *Allium sativum* L. (studies for hybridization). *Ann. Fac. Agrar. Univ. Cattolica Sacro Cuore*, Milan, 22:1: 71-80.
- FOURNIER, B., 1974: Production, controle et certification des semences d'ail, L'ail, 29-34.
- GALOCHKINA, L.A., IVASCHENKO, I.I., 1981: Mosaic of onion in garlic. *Zasch. Rast.* 10:29.
- GIDDINS, N.J., 1916: Report of the Department of Pathology W. *Virg. Agric. Exp. Stn.* 44 pp.
- GRADDON, D.J., & RANGLES, J.W., 1986: Single antibody dos immunoassay—a simple technique for rapid detection of a plant virus. *Journal of Virological Methods*, 13:1: 63-70.
- GRAICHEN, K., & KEGLER, H., 1985: Virus seizing in garlic. *Saat und Pflanzgut*, 26:5: 85-86.
- GRAICHEN, K., REICHENBAECHER, D., & LEISTNER, H.U., 1985: Detection of garlic mosaic virus. *Archiv. Phytopath und Pflanzen*, 21:4: 323-325.
- GRAM, E., 1949: Experiments with mosaic of shallots. *Tijdschr. Pl. Ziekt.*, 55: 150-152.
- HARPAZ, I., 1982: Nonpesticidal control of vector-borne diseases. In: *Pathogens, Vectors and Plant Diseases*. Approaches to control. (Ed. K.F. Harris and K. Maramorosch), 1-19. (Academic Press, Inc. London).
- HAVRANEK, P., 1972: Occurrence of viruses in the genus *Allium* and virus free cloves of common garlic *Allium sativum*. *Plant Virologym* 113-136. Proc. of the 7th Conf. of the Czech. Plant Virologist.
- HAVRANEK, P., & NOVAK, F.J., 1973: The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 68: 308-318.
- HENDERSON, W.J., 1935: Yellow dwarf, a virus disease of onions, and its contro. *Res. Bull. Iowa Agric. Exp. Stn.* 188: 209-255.
- HENDERSON, D.M., 1953: Virus yellows of shallots. *Plant. Pathol.*, 2: 130-133.
- HOLLINGS, M., & STONE, O.M., 1968: Techniques and problems in the production of virus-tested planting material. *Scient. Horti.*, 20: 57-72.
- HOLLINGS, M., BRUNT, A.A., 1981: Potyviruses. In: *Handbook of Plant Virus Infections*. Comparative diagnosis. (Ed. E. Kurstak), 731-807. (Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford).
- HORVAT, F., & VERHOYEN, M., 1975: Inclusions in mesophyll cells induced by a virus causing chlorotic streaks on leaves of *Allium porrum* L. *Phytopath.* Z., 83: 328-340.
- HUTTINGA, H., 1975: Purification by molecular sieving of a leek virus related to onion yellow dwarf virus. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 81: 81-83.
- HWANG, J.M., AN, I.O., CHOI, J.K., 1984: Studies on the production of virus-free plant through tissue culture in garlic. *Res. Rep. Office. Rural Develop.* (Korea R.), 25: 22-30.
- KEHR, A.E., & SCHAEFFER, G.W., 1976: Tissue culture and differentiation of garlic. *Hort. Science*, 11: 422-423.
- LA, Y.J., 1973: Studies on garlic mosaic virus; its isolation, symptom expression in test plants, physical properties, purification, serology and electron microscopy. *Korean Journal of Plant Protection*, 12: 93-107.
- LASTRA, R., LADERA, P., & DEBROT, E.A., 1979: Purification of garlic mosaic virus. *Phytopathology*, 69: 1036 (Abstr).
- LEE, C.E., 1983: On improvement of garlic productivity by inactivation of virus in garlics. *Korean J. Plant Pro.* 20:1: 6-14.
- LIZ., Y., UYEDA, I., SHIKATA, E., 1983: Crucifer strain of tobacco mosaic virus isolated from garlic. *Memoirs of Fac. Agr. Hokkaido (Japan)*, 13:4: 542-549.
- MAGGIONI, L., 1984: Garlic plantlets obtained *in vitro*. *Sementi Elette*, 30:5: 29-31.
- MAKSOD, M.A., 1983: Garlic tissue culture organogenesis in callus culture (Egypt). *Egyptian J. Hort.* 10:2: 107-114.
- MANN, L.K., 1952: Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. *Hilgardia*, 21:8: 195-231.
- MANN, L.K., & LEWIS, D.A., 1956: Rest and dormancy in garlic. *Hilgardia*, 26:3: 161.
- MARANI, F., & BERTACCINI, A., 1980: Risanamento dell'infezione virale dell'aglio mediante coltura di apice meristematici. *Atti. Giorn. Fitopat. Suppl.* 2:23: 30.
- MARROU, J., & FAUVEL, C., 1963: Propriétés serologiques de la mosaïque de l'ail. *Rapp. Act. INRA*, 32-35.
- MARROU, J., & FAUVEL, C., 1964: Comparaison de diverses souches de la mosaïque de l'ail et de la bigarrure (yellow dwarf) de l'oignon. *Rapp. Act. INRA*, 62-65.
- MARROU, J., & CLEMENT, M., 1965: Essais de thermothérapie sur l'ail. *Maladies des plantes maraicheres. Rapport d'activité*, 65.
- MARROU, J., LEROUX, J.P., JOUBERT, J.P., & FOURNIER, B., 1972: Selection sanitaire des semences d'ail en France. *Actas III Congr. Un. Fitop. Medit.* Oeiras, 463-468.
- MARROU, J., MESSIAEN, C.M., QUIOT, J.B., & LEROUX, J.P., 1974: La selection sanitaire des semences d'ail. *L'ail*, 21-24.
- MELHUS, J.E., REDDY, C.S., HENDERSON, W.J., & VESTAL, E., 1929: A new virus disease epidemic on onion. *Phytopathology*, 19:73: 77.
- MESSIAEN, C.M., & ARNOUX, M., 1960: Une maladie de l'ail probablement due à un virus, son influence sur le rendement. *Etude de Virologie appliquée*. INRA, 29-30.
- MESSIAEN, C.M., & PLANTON, G., 1965: Selection sanitaire et production de semences d'ail. *CTIFL documents*, Nov. 1965.
- MESSIAEN, C.M., & MARROU, J., 1965: Selection sanitaire de l'ail: deux solutions possibles au problème de la mosaïque de l'ail, plantes sensibles saines ou plantes virosées tolérantes. *C.R. le J. Phytiat. Phytopharm. circummediterr.*, Marseille, 204-207.
- MESSIAEN, C.M., & LAFON, R., 1970: Les maladies des plantes maraicheres. INRA. Paris, 441 p.
- MESSIAEN, C.M., 1974: Physiologie de l'ail. *L'ail. Compte Rendu des Journées Nationales de l'Ail. Beaumont-de-Lomagne*. 7-10.
- MESSIAEN, C.M., YUCEF-BENKADA, M., & BEYRIES, A., 1981: Rendement potentiel et tolerance aux virus chez l'ail. *Agronomie*: 759-762.
- MIKAMI, T., 1984: Virus-free plant propagation through meristem-tip culture of japanese yam and garlic. *Res. J. Food & Agric.*, 7:4: 17-20.
- MILNE, R.G., & LUISONI, E., 1977: Rapid immune electron microscopy of virus preparations. Páginas 265-281. En: K. Maramorosch and H. Koprowski, eds. *Methods in Virology*. Vol. 6. Academic Press, New York.

- MILNE, R.G., & LESEMANN, D., 1984: Immunosorbent Electron Microscopy. In: Plant Virus Studies. In: Methods in Virology, Vol. III, pp. 850101. (Ed. K. Maramorosch & H. Koprowski) Academic Press.
- MOHAMED, N.A., & YOUNG, B.R., 1981: Garlic yellow streak virus, a potyvirus infecting garlic in New Zealand. *Ann. appl. Biol.*, 97: 65-74.
- MORI, K., 1971: Production of virus-free plants by means of meristem culture. *Japan Agric. Res. Quart.*, 6: 1-7.
- MURASHIGE, T., & SKOOG, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- MURASHIGE, T., 1974: Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
- NOVAK, F.J., 1974: The changes of Karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L., *Caryologia*, 27: 45-54.
- NOVAK, F.J., 1978: Chromosomal characteristics of callus tissue and *in vitro* regenerated plants in *Allium sativum*. XIV Int. Congr. Genetics. Moscow, Abstract, p. 409.
- NOVAK, F.J., 1980: Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Zeitsch. F. Pflanz.*, 84:3: 250-260.
- OGAWA, T., & MATSUBARAN, N., 1983: Studies on the bulb formation of garlic plant. 3: The relation between chilling treatment and day-length during the growing stage. *Kyushu Agric. Res.*, 45: 226.
- OOSAWA, K., KURIYAMA, Y., 1981: Clonal multiplication of vegetatively propagated crops through tissue culture. I. Effective balance of auxin and cytokinin in the medium and suitable explant part for mass production of plantlets in strawberry, garlic, scallion, welsh onion, yam and taro. *Bull. Veg. Ornament. Crops. Res. Sta. Series A*, 9: 1-46.
- PAIVA, E., DANIELS, J., ASSIS, M. de, CASTRO, L.A., 1984: Utilization of immunologic techniques for diagnosis the virus responsible for garlic yellows stripe. *Unid. Exec. Pesquisa*. Cascata, Brasil, No. 20: 3 p.
- PEÑA-IGLESIAS, A., & AYUSO, P., 1973: A new and accurate way of heat therapy of plants grown *in vitro* applied to the sanitary selection of Spanish grapevine varieties. *Rev. Pat. Veg.*, IX: 172-174.
- PEÑA-IGLESIAS, A., & AYUSO, P., 1973: Identificación y estudio de una nueva estirpe WMV-2 del virus del mosaico de la sandía como causa de la enfermedad llamada en España mosaico de melón. *Primer Premio Nacional de Investigación Agraria 1972*. Monografía No. 20. Ministerio de Agricultura.
- PEÑA-IGLESIAS, A., & AYUSO, P., 1974: Meristem-tip culture of garlic: Elimination of viruses from infected bulbs and rapid multiplication of virus-free clones. *Proc. of the XIX International Horticultural Congress*. Vol. 1A: 62. Warszawa.
- PEÑA-IGLESIAS, A., 1975: Virosis de las hortalizas españolas más importantes (tomate, pimiento, berenjena, cebolla, ajo, puerro). Descripción y control de virus identificados y de otros no detectados. Fundación Juan March. 327 páginas.
- PEÑA-IGLESIAS, A., *et al.*, 1975: Some characteristics of the potyvirus of some cultivated Liliaceous plants (garlic, leek, onion) detected in Spain. 3rd International Congress for Virology, C456, p. 273.
- PEÑA-IGLESIAS, A., FRESNO, J., & SHEPHERD, R.J., 1982: Ultrastructural comparison of virus infested Spanish and Californian garlic. 10th International Congress on Electron Microscopy, Vol. 3: 153-154. (Alemania R.F.).
- PEÑA-IGLESIAS, A., & AYUSO, P., 1983: Characterisation of Spanish garlic viruses and their elimination by *in vitro* shoot apex culture. *Acta Horticulturae*, 127: 183-193.
- PEÑA-IGLESIAS, A., FRESNO, J., & VILLEGAS, T., 1984: Selección clonal y sanitaria de ajos españoles. Actas del I Congreso Ibérico de Microscopía Electrónica, 22-23 Oct., p. 26.
- PEÑA-IGLESIAS, A., AYUSO, P., VILLEGAS, T., 1986: La eliminación de los virus del ajo por cultivo de meristemas y la producción rápida de ajos sanos (micropropagación *in vitro*, esquejado vegetativo). Presentado, aceptado y no publicado en el número especial de Anales del INIA *in memoriam* D. Miguel Benloch.
- PEÑA-IGLESIAS, A., & VECINO, B., 1986: Novel cytopathic effects found in tomato and *Gynura aurantica* D.C. leaf epidermal tissues respectively infected with potato spindle tuber and citrus exocortis viroids. *Cell Biology I.R.*, 10:8: 677-682.
- PEÑA-IGLESIAS, A., & VECINO, B., 1987: Cytological studies of grapevine leafroll infected tissue: Further evidence of viroid etiology and improvement of diagnosis. *Vitis (RFA)*, 26: 37-41.
- PO JEN WAN, LI CHUN HUANG, 1974: Studies on the shoot meristem culture of *Allium sativum sativum* L. *Journal of Chinese Soc. of Hort. Sci.*, 220:2: 79-87.
- PRADEL, J., 1979: L'ail: Des rendements accrus grace a l'amélioration sanitaire. *France Agric.*, 35:1757-67.
- QUIOT, J.B., MESSIAEN, C.M., MARROU, J., & LEROUX, J., 1972: Regeneration par culture de méristèmes des clones d'ail infectés de la mosaïque de l'ail. *Actas III Congr. Un. Fitop. Medit. Oeiras*, 429-432.
- QUIOT, J.B., MARROU, J., LUIS, M., & DUTEIL, M., 1974: Les maladies a virus de l'ail et leur epidemiology. *L'ail*, 11-14.
- SAKUMA, Y., & KAWAMURA, K., 1981: A method for the meristem tip culture of garlic and cultivation method of its culture plants. *Tohoku Agric. Res.*, 29: 219-220.
- STEFANAC, Z., 1977: Onion yellow dwarf virus in Yugoslavia. *Acta Bot. Croat.*, 36: 39-45.
- STEFANAC, Z., 1980: Cucumber mosaic virus in garlic. *Acta Bot. Croat. Vo.* 39: 21-36.
- SHEPHERD, R.J., 1974: Comunicación personal. Carta 11 de julio de 1974.
- SHEPHERD, R.J., & PEÑA-IGLESIAS, A., 1979: Identity of viruses of garlic and globe artichoke in Spain and the USA. USDA and NSF report.
- SMALLEY, E.B., 1956: The production on garlic by an Eryophid mite of symptoms like those produced by viruses. *Phytopathology*, 46: 346-347.
- TAHEREMUSHKINE, N.P., 1974: Electron microscopy ultrathin sections study of the relationship between *Allium sativum* mosaic virus and its vector-mite *Aceria tulipae* L. *Comm. Inst. Biol. Pedol. Vladivostok*, 28: 174-177.
- TASHIRO, Y., HASHIMOTO, H., MIYAZAKI, S., & KANAZAWA, K., 1984: *Allium* protoplast isolated from different organs and tissue. *Bull. of Fac. Agric. Segu Univ. (Japón)*, 57: 115-119.
- TIZIO, R., 1979: Floraison *in vitro* de l'ail. *C.R. Acad. Scien. Ser. D (France)*, 289: 401-404.
- TOMLINSON, J.A., 1982: Chemotherapy of plant virus diseases: In: *Pathogens Vectors and Plant Diseases: Approaches to control* (Ed. K.F. Harris & K. Maramorosch) 23-44. Academic Press.

- TULEGENEV, T.A., 1972: Virus disease of onion and garlic in the Alinata region. *Biologicheskaya*, 10: 33-38.
- WETTER, C., & MILNE, R.G., 1981: Carlaviruses. In: *Handbook of Plant Virus Infections* (Ed. E. Kurstak), 695-730. Elsevier.
- WOO LEE, Y., YAMAZAKI, S., OSAKI, T., & INOUE, T., 1979: Two elongated viruses in garlic, garlic latent virus and garlic mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 45: 727-734.
- WRIGHT, R.C., & PEACOCK, W., 1934: Influence of storage temperatures on the rest period and dormancy of potatoes. *USDA Tech. Bull.*, 424.
- YARWOOD, C.E., 1972: Virus transmission from *Chenopodium amaranticolor*, *Pl. Dis. Rep.*, 56: 1085-1086.
- YOUCEF, M., 1980: Comparaison de variétés d'ail saines et virosées pour la coloration des feuilles et la productivité. INRA-ENSA. Montpellier. 36 p.