

Obtención de semilla de ajo de sanidad controlada

Viotti, G.
Laboratorio Agroplant
Córdoba - Argentina

gloria@agroplant.com.ar

Si bien el cultivo de ajo acompaña al hombre desde hace más de 5.000 años, la producción de semilla botánica obtenida por polinización directa de sus flores, ha sido un desafío superado en forma reciente. Sin embargo, esto no sucede naturalmente, y en la actualidad se utiliza exclusivamente con fines de mejoramiento genético.

Por ello la producción comercial se realiza únicamente mediante reproducción agámica a partir de los bulbillos ó "dientes", lo que se denomina vulgarmente "semilla".

Esta forma de multiplicación presenta una serie de inconvenientes de índole fitosanitaria, ya que el cultivo de ajo puede ser afectado por varias enfermedades de origen fúngico, bacteriano y/o viral que se reproducen de forma indefinida mediante este sistema. Esto implica que los lotes vayan deteriorando su calidad generación tras generación, obligando a pensar en metodologías especiales para revertir esta situación.

Semilla Fiscalizada

La semilla juega un rol muy importante en el manejo de tecnologías para optimizar la producción. Ella sola explica más del 70% del rendimiento potencial a alcanzar.

En el ajo, y aún contemplando su carácter agámico, es aplicable el concepto de Calidad Total de la Semilla, dada por la sumatoria de las cuatro componentes o atributos que condicionan su capacidad para dar origen a plantas de alta productividad. Estos atributos contemplan el aspecto Genético, Físico, Fisiológico y Sanitario.

El término calidad es relativo, y se puede expresar como nivel o grado de calidad solamente cuando es comparado con un estándar determinado. La Legislación de Semillas (INASE, Res. 20247/73), y específicamente las Normas de Producción de Semilla de Ajo Fiscalizada (INASE, Res. 242/98) establecen los mismos en Argentina.

Según esta última, se establecen las categorías: BÁSICA (subcategorías PREINICIAL, INICIAL y FUNDACIÓN), REGISTRADA (Subcategorías A y B) y CERTIFICADA. La subcategoría Pre inicial, proviene de CRIADEROS, y es sometida a técnicas de exclusión de las plagas y enfermedades que lo afectan, en ambiente controlado de laboratorio.

Queda explícito así que la producción de Semilla Fiscalizada, está directamente relacionado con los Programas de Mejoramiento Genético, ya que los Criaderos son los responsables de producir nuevas variedades ("semilla original"), que son luego tomadas por los Laboratorios-Semilleros para su limpieza y multiplicación.

Las restantes categorías derivan de la multiplicación de la primera, y deben cumplir con los límites propuestos para la misma respecto a características genéticas, físicas, fisiológicas y sanitarias.

Aspecto sanitario de las normas de producción de semilla

Una de las principales diferencias entre los sistemas de producción de semilla botánica respecto a la de ajo, es que el atributo sanitario adquiere una importancia particular.

Teniendo en cuenta las pérdidas que producen, ya sea en el rendimiento o en la calidad, y las enfermedades y plagas registradas en el país, el INASE determinó el listado de patógenos para los cuales se dispusieron tolerancias y la metodología para su evaluación (INASE, Res. 255/98), así como los requisitos de los Laboratorios Habilitados para tal fin (INASE, Res. 243/98).

En el análisis micológico se detectan y cuantifican los hongos *Helminthosporium allii* Campanile (Ajo cabeza negra o Carbonilla), *Fusarium spp.* (responsable de enfermedades tales como las Manchas de herrumbre del diente y la Podredumbre del disco basal, entre otras) y *Penicillium spp.* (Podredumbre verde o Moho azul, Decaimiento de la semilla).

Por otra parte, y según lo establece el Art. 6° de la Res. 242/98, la presencia de *Sclerotium cepivorum* Berk. (Podredumbre blanca del ajo) y *S. rolfsii* Sacc. (Podredumbre) inhabilita al lote para su uso como semilla.

Respecto del análisis virológico, se evalúa la presencia de un único virus, el Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV- Potyvirus).

Debido a las características de los test sugeridos por esta Norma, el muestreo se realiza antes de que el cultivo pierda su follaje, ya que se usan tejidos foliares.

Las plagas con tolerancias específicas, son ácaros y nematodos. *Aceria tulipae* Keifer y *Rhizoglyphus spp.*, del primer grupo, y *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev son las entidades que cuentan con un protocolo establecido y homologado. Las especies aquí mencionadas, establecen diferentes relaciones con los tejidos de la semilla.

Algunas permanecen en forma externa a los tejidos de reserva, usando las catáfilas como refugio (ácaros), o los invaden de manera superficial o profunda (nematodos y algunos hongos). Sin embargo otras, como los virus y algunos hongos sistémicos, se ubican en tejidos específicos, como los haces vasculares o tejidos del parénquima.

Estos establecen un vínculo mucho más estrecho con la semilla, pueden pasar inadvertidos a la observación visual y son más difíciles de controlar.

Definición de “semilla de sanidad controlada”

En esta especie ya se ha mencionado que el atributo sanitario adquiere una importancia particular. Al respecto, la posibilidad real de exclusión de patógenos y plagas de la unidad seminal, es válida solo para algunos de ellos (plagas, algunos hongos y bacterias).

Para otros, las dificultades no solo se presentan para eliminarlos, sino también para comprobar si la metodología usada ha sido exitosa. Los virus, viroides y fitoplasmas se encuentran en este grupo, constituyendo así las enfermedades de mayor preocupación para los programas de limpieza de materiales.

Una limitante de importancia, es la disponibilidad de medios masivos, económicos y suficientemente sensibles para detectarlos. Por ello la expresión “semilla libre de virus” es demasiado ambiciosa, sumado al hecho de que ya se han descrito un número importante de entidades virales infectando esta especie.

Por esta razón es que, a toda semilla proveniente de un proceso de limpieza sanitaria en laboratorios especializados, ya sea bajo el Sistema de Certificación Oficial, o fuera del mismo, la denominación adecuada sería “semillas de sanidad controlada” o “semilla saneada”. En estos casos se asegura la liberación de las entidades virales específicas evaluadas.

Además del OYDV, existen otros virus infectando al ajo en el país. Ellos pueden clasificarse, de manera sencilla, en dos grandes grupos. Los que se transmiten por áfidos y/o en forma mecánica:

- *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV)
- *Leek Yellow Stripe Virus* (LYSV),
- *Garlic Common Latent Virus* (GCLV)
- *Shallot Latent Virus* (SLV)
- *Carnation Latent Virus* (CLV)

El otro grupo, los Allxivirus, se transmiten por ácaros:

- *Garlic Virus A* (GarV-A)
- *Garlic Virus C* (GarV-C)

Para el primer grupo, existen reactivos comerciales para usar mediante técnicas serológicas comunes, como DAS-ELISA. Esta permite evaluar masivamente numerosos individuos producidos en un esquema de saneamiento, sin embargo, los Allxivirus, carecen aún de métodos convencionales aplicables a situaciones de producción masiva.

Producción de “semilla de sanidad controlada”

La biotecnología ha sido la piedra fundamental para la producción de semilla de ajo de “sanidad controlada”. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es la técnica que mayor aporte práctico ha brindado, trascendiendo en forma exitosa para la producción de propágulos.

Los primeros trabajos relacionados con la obtención de plantas de ajo libres de virus mediante su uso, fueron en 1974, y en 1976. Su posterior difusión, hizo que se integrara a los programas de producción masiva de semilla, como una forma sencilla de mejorar la sanidad, acompañando en muchos casos el mejoramiento genético.

- **Selección del explanto**

Debido al carácter totipotencial de las células vegetales, es posible utilizar cualquier parte de la planta para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro*. Es así que pueden utilizarse meristemas apicales, meristemas del escapo floral, yemas axilares de bulbos inmaduros, ápices radiculares y meristemas apicales y radiculares, entre otros.

Sin embargo, los meristemas apicales localizados en el extremo del primordio del tallo previo a su desarrollo, son los explantos más utilizados. El término “meristema” aquí utilizado tiene un sentido amplio, ya que los tejidos embrionarios (células meristemáticas en sentido estricto), son generalmente acompañados por uno o dos primordios foliares.

El tamaño de los meristemas no es fijo, sino que varía con el estado de dormición del bulbillo donante. El mismo posee 0,2-0,3 mm de diámetro cuando está en dormición, alcanzando 0,5-0,8 mm cuando alcanza un Índice Visual de Dormición (IVD) del 80%, aún cuando la unidad funcional extraída es la misma.

La incorporación de/l primordio/s foliares tiene el objetivo de asegurar la regeneración de una planta idéntica a la que le dio origen, evitando en lo posible, la formación previa de un callo que aumenta la probabilidad de producción de variantes genéticas espontáneas.

En los sistemas de Fiscalización de Semilla este es un efecto no deseado, ya que el objetivo no es la inducción de variantes, sino la limpieza de los materiales ya seleccionados, con la reproducción exacta del germoplasma original.

Por lo tanto, es una resolución de compromiso seleccionar el tamaño adecuado, ya que deberá ser suficientemente pequeño, para evitar extraer tejidos contaminados con virus, y al mismo tiempo garantizar la reproducción exacta del genotipo original.

Se trabaja, entonces, con la ayuda de herramientas que magnifican la visión, como son las lupas estereoscópicas.

- **Tratamientos previos**

Cuando el cultivo *in vitro* de meristemas no alcanza para minimizar el efecto de los virus, se desarrollan otras técnicas complementarias. El objetivo de las mismas es reducir el inóculo (partículas virales), en los tejidos meristemáticos, o dar condiciones que favorezcan la velocidad de crecimiento de la planta, respecto a la multiplicación viral para extraer luego esta porción.

La termoterapia ha sido ampliamente utilizada con resultados diversos. En este caso, las plantas seleccionadas se someten a períodos de entre 15 y 75 o más días, a temperaturas que oscilan entre los 32 °C a 42 °C. En algunos casos se logran plantas libres de virus, pero la sobrevivencia inicial es baja.

- **Requisitos de asepsia**

Las tareas de aislamiento del explanto de los tejidos del órgano donador, se realizan en condiciones de asepsia. Para esta actividad se usa equipamiento adecuado, para asegurar el aislamiento absoluto de posibles contaminaciones con microorganismos saprofitos y re infecciones de patógenos.

Las cámaras de flujo laminar debidamente acondicionadas en una sala con aislamiento, cumplen esta función, evitando pérdidas económicamente importantes en esta etapa. El material vegetal, se desinfecta superficialmente, previo a su uso. Los agentes químicos más utilizados son el etanol (70% v/v) y el hipoclorito de sodio (1 a 3%), por ser los más inocuos para el operario, y sus residuos son fáciles de eliminar de la superficie del material tratado.

A estos se le pueden añadir algunas gotas de un detergente para reducir la tensión superficial y mejorar la penetración de los desinfectantes. Una vez pasado el tiempo establecido, se lavan los tejidos con agua destilada esterilizada al menos 3 veces para evitar que los productos sigan actuando, y terminen afectando los tejidos útiles.

- **Medios de cultivo**

Existe una gran diversidad de medios propuestos para el cultivo *in vitro* de tejidos de ajo. Esto es debido a las respuestas diferenciales de los genotipos utilizados en los distintos programas. En general, constan de una base de macronutrientes y micronutrientes propuesta por Murashige y Skoog (MS) o por Gamborg (B5), enriquecidas con las vitaminas inositol, ácido nicotínico, piridoxina y tiamina, y se agrega sucrosa como fuente de carbono (2% a 3%).

Las fitohormonas más utilizadas son el Ácido Indol Acético (AIA) y Ácido Naftalen Acético entre las Auxinas, y Citocininas, 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2 isopentenil-adenina (2-iP). Las concentraciones varían entre 0,1 y 3 miligramos en forma individual, y cambian las relaciones entre ellas según el objetivo.

Para los genotipos locales, el uso de medio general enriquecido con 2-iP y ANA (0,5 y 0,1 mg/l respectivamente) producen una regeneración satisfactoria, superando el 80% (datos propios no publicados).

Es factible inducir la multiplicación cambiando las cantidades absolutas y relativas de estas mismas hormonas (3 y 0,3 mg/l), en las soluciones bases arriba descritas. Las tasas son variables, ya que hay genotipos que se inducen fácilmente, y otros donde prácticamente la multiplicación es nula.

En la mayoría de los procesos de saneamiento se utilizan medios solidificados. Sin embargo se lograron buenos resultados en medios líquidos, utilizando biorreactores con inmersión temporal.

Etapas para la obtención de "semilla de sanidad controlada"

La producción de semilla de sanidad controlada, debe partir de la selección de materiales promisorios. Estos programas tienen su asiento principal en instituciones como el INTA y las Universidades Nacionales, sin embargo se cuenta con productores que también realizan actividades de selección, separando los materiales que mejor se comportan en su propio ambiente.

Al continuar el trabajo de los mejoradores y establecimientos inscriptos como Criadero, automáticamente los materiales entran a la categoría Básica, con homogeneidad genética garantizada por el registro de la variedad en el Catálogo Nacional de Cultivares, dependiente de la Dirección de Registro de Variedades del INASE.

En el segundo caso, se obtendrá la categoría Certificada Proveniente del Sistema de saneamiento, y por único año se podrá vender como "semilla".

El proceso de "limpieza" se inicia con la extracción de los meristemas apicales del primordio caulinar, que se encuentra protegido por la hoja de reserva y sus catáfilas.

Luego de la desinfección superficial del bulbillo procesado (se quitan parcialmente los tejidos de cobertura), bajo una lupa y en condiciones de esterilidad, se extrae el explanto y se coloca en un tubo con el medio seleccionado para la regeneración de las micro plantas (plantas criadas bajo condiciones artificiales dentro de contenedores aislados del ambiente, y nutricionalmente dependientes del aporte artificial).

Estos contenedores se mantienen en un ambiente con control artificial de temperatura, luz y humedad. Se impone un fotoperíodo de 16-8 horas de luz-oscuridad, 22 ± 2 °C y al menos 85% de Humedad Relativa. Bajo estas condiciones, la mayoría de las variedades locales diferencian una microplanta de aproximadamente 10 cm al cabo de 70-90 días. Sin embargo, existen casos donde este período se acorta a 45-60 días, o se prolonga hasta 150 días (datos propios, no publicados).

Normalmente se cambian de tubo los explantos en crecimiento (subcultivan), con el objetivo de renovar el medio que va perdiendo sus nutrientes y deshidratando. Las plantas que se contaminan, ya sea con microorganismos saprófitos externos, o infecciones sistémicas de hongos y/o bacterias remanentes del bulbillo original, se descartan.

Por las características del procedimiento, quedan excluidas las plagas como nematodos y ácaros, en forma directa al separar los tejidos del bulbillo para extraer el meristema.

Estas plantas se multiplican mediante micro propagación, o clonación en medio aséptico (Figura 1), constituyendo una "familia" genotípica y sanitariamente idéntica. Este conjunto proveniente de un único meristema, habitualmente recibe la denominación de mericlón. Al igual que en la regeneración, el tiempo entre multiplicaciones guarda una relación estrecha con el genotipo, con tiempos mínimos de 35-40 días.



Figura 1 - Micropropagación *in vitro*

En esta etapa cada mericlón se somete a un primer análisis viral. Los que resultan positivos (enfermos para el/los virus evaluados), se eliminan descartando todas las plantas del mericlón; se mantienen en el sistema los de reacción negativa.

Es necesario recordar que, como se ha explicado anteriormente, en los programas masivos de producción de semilla, prácticamente la única técnica que se adapta para analizar un número importante de introducciones, es la inmunoenzimática ELISA.

Si bien es una técnica sensible, la escasa concentración de partículas que puede tener una micro plantas, puede reaccionar como un falso negativo. En la actualidad, hay un sinnúmero de metodologías de detección disponibles en Argentina pero debido a sus costos, quedan fuera del alcance de los programas de semillas, sin embargo, su aporte es de suma importancia para los trabajos de investigación y mejoramiento.

Las plantas deben prepararse para su trasplante a tierra. Es la etapa más delicada, y suele llevar a fracasos reiterados. Cada unidad deberá contar con una raíz más o menos desarrollada, para sostener a la misma e iniciar el proceso autotrófico absorbiendo agua y nutrientes del suelo.

En la última multiplicación, algunos técnicos agregan o cambian las dosis de las fitohormonas para inducir la formación de raíces, si las mismas son escasas. Una alternativa con excelentes resultados, consiste en transplantar las microplantas en bandejas con sustrato estéril, y mantenerlas en la misma cámara de cría hasta lograr la rusticidad suficiente para llevarlas al suelo o a maceta.

Otros esquemas de producción, contemplan la formación de microbulbillos (inducción de la bulbificación *in vitro*), para lograr un órgano con más reservas que facilita el manejo durante el trasplante.

Se debe poner a punto esta tecnología ya que los bulbillos así formados, son fisiológicamente heterogéneos, y pueden generar brotaciones muy desperejadas.

Una vez llevadas a campo, ya sea las micro plantas o los micro bulbillos, se deben respetar las necesidades ambientales de la variedad y tomar los recaudos correspondientes para aislar el cultivo de los vectores responsables de la re infección de virus.

Se utilizan jaulas con techo transparente (vidrio o plástico), y paredes de malla antiáfidos, fertirrigación y tratamientos fitosanitarios automáticos, sin embargo los macrotúneles de malla antiáfido cumplen la misma función de aislamiento, y tienen un precio marcadamente inferior.

Al entrar nuevamente en contacto con la tierra, hay que magnificar los cuidados pre y post plantación para evitar el ingreso de plagas y enfermedades que afectarán el valor del bulbo. Los mericlones mantienen su individualidad, y antes que las hojas comiencen a amarillar, se toman muestras para realizar un nuevo análisis. Se mantiene el mismo criterio arriba descrito en el caso de plantas positivas para el/los análisis.

A partir de esta etapa se observa además la presencia de variantes genéticas, plantas fuera de tipo, u otras manifestaciones morfo-fisiológicas que no respondan al germoplasma inicial.

El proceso de trasplante, y posterior cosecha y acondicionamientos son exclusivamente artesanales, ya que aquí se recogen y mantienen todos los bulbos formados, aún los más pequeños o los "ajos machos".

Con un ciclo más a campo, se estabilizan totalmente los materiales salidos del cultivo *in vitro*, comenzando a mostrar su potencial. Esta categoría, INICIAL, es la primera que se multiplicará a campo fuera de las condiciones controladas. Mientras mayores sean los cuidados, y más aislados se mantengan los materiales, aumentará la probabilidad de mantener las categorías. En la Figura 2 se muestra un esquema del proceso de obtención de semilla saneada.

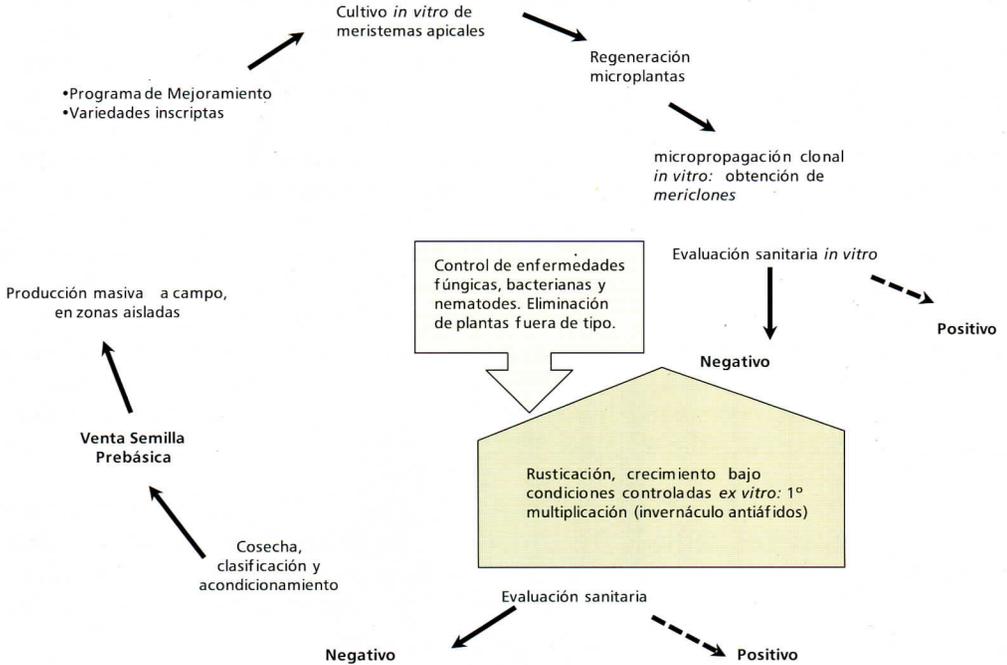


Figura 2 - Esquema de Producción de Semilla de Ajo de Sanidad Controlada

Renovación de la semilla

En un esquema estabilizado, el semillero deberá ir incorporando entre el 20% y 25% del material Inicial para mantener la calidad comercial. Numerosos trabajos indican que la re infección es muy rápida, llegando en algunos casos al 100% en el primer año.

Esto se debe principalmente a la presencia de numerosas especies de pulgones capaces de funcionar como vectores, a los que actualmente se suman los ácaros. Este porcentaje está directamente relacionado con la distancia a la fuente de inóculo (cultivos infectado principalmente).

Si bien es muy difícil observar pulgones en el ajo, los virus que estos transmiten, lo hacen de manera no persistente; las picadas de prueba son suficientes para que la transmisión sea exitosa. Además están altamente capacitados para movilizarse con la ayuda de las corrientes del aire. Es correcto evaluar entonces, no solo las distancias sino la dirección de los vientos predominantes, al momento de tomar la decisión sobre la ubicación del lote de semilla.

En la re infección intervienen virus que afectan no solo al ajo, sino también a la cebolla, al puerro y al chalote. Se deberá excluir del área semillera, además de lotes comerciales de ajo, estas especies.

Las infecciones van produciendo la reducción continua del diámetro y peso de los bulbos, con la consiguiente caída en el rendimiento y la calidad. No fue sino hasta que se lograron semillas saneadas, que se pudieron cuantificar las pérdidas.

Los valores difieren significativamente entre autores, y se registran algunos que superan el 200%, sin embargo, es factible que así suceda porque se trata de diferentes variedades, con distintos potenciales de rendimiento, diferentes tamaños de bulbos y número de bulbillos, sumados a los restantes problemas sanitarios que acumulan los ajos crónicamente infectados de cualquier lugar del mundo.

Resumiendo, es necesario remarcar que Argentina cuenta con un Sistema de Fiscalización de Semilla regulado por Normas específicas.

Estas contemplan no solo el aspecto genético, sino también el sanitario, existiendo por lo tanto, un marco legal que avala la actividad de los semilleros y laboratorios especializados en la producción de "ajos de sanidad controlada" o "saneados" (Figura 3).

Cualquier productor que quiera optimizar la producción, deberá manejar las tecnologías de producción, dentro de las cuales la "semilla", juega un rol fundamental.



Figura 3 - Aspecto general de plantas de ajo saneadas

Bibliografía

- AYUSO, P. y A. PENA-IGLESIAS. 1981. The elimination of garlic viruses by thermotherapy and/or tissue culture. *Cell Biol Int Rep* 5(9):835.
- BARNADIARAN, X.; N. MARTÍN, C. ALBA, RODRIGUES-CONDE; A. DI PIETRO and J. MARTÍN. 1991. An efficient method for the in vitro management of multiple garlic accessions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 35(6) 466-499.
- BERTACCINI; A., BOTTI, S.; TABANELLI, D.; DRADI, G.; FOGHER, C.; PREVIATI, A. and DA RE, F. 2004. Micropropagation and establishment of mite-borne virus-free garlic (*Allium sativum*). *Acta Hort. (ISHS)* 631:201-206.
- BOS, L. 1976. Onion yellow dwarf virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses No. 158.
- BOS, L. 1981. Leek yellow stripe virus C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses No. 240.
- BRUNA, A. 1997. Effect of thermotherapy and meristem-tip culture on production of virus-free garlic in Chile. *Acta Hort. (ISHS)* 433:631-634.
- BURBA, J.L. 2009. Mejoramiento genético y producción de "semilla" de ajo (*Allium sativum* L.). Posibilidades de adaptación a diferentes ambientes. *Rev. Colombiana de Ciencias Hortícolas* (3)1:28-44.
- CAFRUNE, E.E.; PEROTTO, C., and CONCI, V.C. 2006. Effect of two Alexivirus isolates on garlic yield. *Plant Dis.* 90:898-904.
- CANAVELLI, A.; NOME, S. and CONCI, V.C. 1998. Incidencia de las virosis en cultivos de ajo Rosado Paraguayo. *Fitopatol. Bras.* 23:354-358.
- CARVALHO, M.G.; SHEPHERD, R.R. and HALL, D.H. 1981. Virus em clone de alho sem sintomas e liberto do Garlic yellow stripe virus. *Fitopatol. Bras.* 6:236.
- CASTILLO, O.E. 1996. Producción de minibulbillos de ajo (*Allium sativum* L.) bajo diferentes condiciones de manejo cultural. Efecto del tamaño y densidad de plantación de microbulbillos. Biblioteca FCA-UNC.
- CLARK, M.F., and ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-482.
- CONCI, V. C. 1997. Virus y fitoplasmas de ajo. Pages 267-291. In: 50 temas sobre producción de ajo, Vol. 3. J.L. Burba, ed. EEA-INTA La Consulta, Mendoza, Argentina.
- CONCI, V. C. and NOME, S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J. Phytopathol.* 132:186-192.
- CONCI, V.C.; CANAVELLI, A.; LUNELLO, P.; DI RIENZO, J.; NOME, S.F.; ZUMELZU, G.; and ITALIA R. 2003. Yield losses associated with virus infected garlic plants during five successive years. *Plant Dis.* 87:1411-1415.

- CONCI, V.; P. LUNELLO; D. BURACHI; R.R. ITALIA and S. NOME. 2002. Variations of Leek yellow stripe virus concentration in garlic and its incidence in Argentina. *Plant Disease* 86(10) 1085-1088.
- CONCI, V.C.; PEROTTO, M.C.; CAFRUNE, E. and LUNELLO, P. 2005. Program form intensive production of virus-free garlic plants. *Acta Hort. (ISHS)* 688:195-200.
- ETOH, T. 1997. True seeds in garlic. *Acta Hort. (ISHS)* 433:247-256.
- GAMBORG, O.L.; R.A. MILLER R.A. and K. OJIMA 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158.
- HELGUERA, M.; F. BRAVO-ALMONACID; K. KOBAYASHI; P.D. RABINOWICZ; V. CONCI and A. MENTABERRY. 1997. Immunological Detection of a GarV-Type Virus in Argentine Garlic Cultivars. *Plant Disease* 81(9)1005-1010.
- INASE. 1973. Ley Nacional 20.247 de Semillas y Creaciones Fitogenéticas. Bs. As., 30/3/73.
- INASE. 1998. Metodología de análisis para determinar la calidad de los bulbos de ajo destinados a semilla. Resolución 255/98. Bs. As., 23/10/98.
- INASE. 1998. Producción de Semilla de Ajo Fiscalizada. Resolución 242/98. Bs. As., 13/10/98.
- INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS. 1998. Habilitación y Funcionamiento de Laboratorios de Análisis de Semilla de Ajo. Resolución 243/98. Bs. As., 13/10/98.
- IZQUIERDO OVIEN, H. y Y. QUIONES OCEGUERA. 2001. Obtención de semilla de ajo mejorada mediante el empleo de técnicas biotecnológicas. *Temas de ciencia y Tecnología. Univ. Tecnológica de la Mixteca. Oaxaca. México.* 15: 48-64.
- JENDEREK, M.M. 2005. Within-and Between-family Variability for Important Bulb and Plant Traits among Sexually Derived Progenies of Garlic. *HortScience* 40(5): 1234-1236.
- JENDEREK, M.M. AND R.M. HANNAN. 2004. Variation in reproductive characteristics and seed production in the USDA garlic germplasm collection. *HortScience* 39(3): 485-488.
- KIM, E.K.; E.J. HAHN; H.N. MURTHY and K.Y. PAEK. 2004. Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor systems. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79(5)818-822.
- MA, Y., WANG, H.L.; ZHANG, J.; KANG, Y.Q. 1994. High rate of virus free plantlet regeneration via garlic scape tip culture. *Plant Cell Rep.* 14:65-68.
- MUHAMMAD, S.H.; TOMIKICHI W. and K. HATTORI. 2003. Shoot Regeneration and Bulblet Formation from Shoot and Root Meristem of Garlic Cv Bangladesh Local. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2: 23-27.
- MUÑOZ, J.O.; SALVADORES, C.; VIOTTI, G.; BARRIO, A; FRADE, C. y C. MARTINO. 1988. Saneamiento por medio del cultivo de meristemas de clones de ajo (*Allium sativum* L.) seleccionados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias. *Res. En: Segundas Jor. Inv. de la F.C.A.- U.N.C.*: 75.

- MUÑOZ, J.O.; VIOTTI, G.; MEDINA, G. y V. YOSSEN. 1990. Saneamiento de clones de ajo seleccionados en la Facultad de Ciencias Agropecuarias. RIA 22 (1): 322.
- MUÑOZ, J.O.; VIOTTI, G. y M.C. SALVADORES. 1999. Disminución en los rendimientos debido a virus en multiplicaciones sucesivas en ajo Rosado Paraguayo. VI Curso/ Taller sobre Prod., Com. e Ind. de ajo. Pag. 161.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- PEIWEN, X.; HUIHENG, S.; RUIJIE, S. and YUANJUN, Y. 1994. Strategy from the use of virus-free seed garlic in field production. *Acta Hort. (ISHS)* 358:307-314.
- PEIWEN, X.; YANG, C. and YANG, C.Y. 2005. Biotechnology applied to garlic and onion. *Acta Hort. (ISHS)* 688:59-64.
- PEROTTO, M.C.; E.E. CAFRUNE and V.C. CONCI. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with Allieviruses. *European Journal of Plant Pathology* 126(4): 489-495.
- POOLER, M. and SIMON, P. 1994. True seed production in garlic. *Sex. Plant Rep.* 7(5):282-286. Issn: 0934-0882.
- RACCA, R.W.; A. LOSAN, G. DE BILLERBECK, V. CONCI y O. BONGIORNO. 1989. Microbulbificación sincronizada in vitro en ajos de sanidad controlada. En: XII Reunión de la Sociedad Argentina de Horticultura. Resúmenes, p.35.
- ROBLEDO-PAZ, A.; V.M. VILLALOBOS-ARÁMBULA y A.E. JOFRÉ-GARFIAS. 2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture *Journal In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36(5) 5: 416-419.
- SIMON, P.W.; JENDEREK, M.M. 2003. Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. *Plant Breeding.* 32:211-244.
- SOSA, C.; MUÑOZ, J.; NAVELINO, P. and GONZÁLEZ, H. 1997. Evaluation of re-infection by virus in virus-free garlic "Rosado Paraguayo" grown in Córdoba; survey for vectors. *Acta Hort. (ISHS)* 433:601-606.
- TORRICO, A.K.; E.E. CAFRUNE, and V.C. CONCI. 2010. First Report of Shallot latent virus in Garlic in Argentina. *Plant Disease* 94(7): 915.
- UCMAN, R. and M.R. JANA ŽEL. 1998. Thermoherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. *Scientia Horticulturae* 73(4): 193-202.
- VIOTTI, G.; ORTEGO, J.; SALVADORES, M.C. y J. MUÑOZ. 1999. Reinfeción por Potyvirus en ajo Colorado en Malargüe, Mendoza, Argentina. VI Curso/Taller sobre Prod., Com. e Ind. de ajo. Pág. 165.
- WALKEY, D.G.A. and ANTILL, D.N. 1989. Agronomic evaluation of virus-free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). *J. Hortic. Sci.* 64:53-60.
- WALKEY, D.G.A.; M.J.W. WEBB; C.J. BOLLAND and A. MILLER. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of Horticultural Science* 62 (2): 211-220.