

OBTENCIÓN DE PLANTAS PRODUCIDAS IN VITRO DE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.) LIBRES DE POTYVIRUS

José Efraín González Ramírez*, Diosdada Galvez Guerra, Alay Jiménez Medina, Vanier Ventura Chávez.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Apartado 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, Cuba.

*Autor para la correspondencia: diagnostico@inivit.cu

Recibido: 14 de septiembre de 2022; Aceptado: 19 de octubre de 2022

RESUMEN

El Ajo (*Allium sativum* L.) es una planta herbácea consumida como alimento y, como parte de la medicina tradicional, para la prevención de enfermedades infecciosas en todo el mundo desde tiempos ancestrales. De la misma forma que otros cultivos propagados vegetativamente, la mayoría de los cultivares comerciales de ajo están infectados por múltiples virus pertenecientes a varios géneros en lo que es conocido como “complejo viral del ajo” con pérdidas de, entre 25 y 50% de los rendimientos y la disminución de la calidad del diente. Las infecciones más importantes son causadas por miembros de tres familias virales *i.e.* *Potyviridae* (género Potyvirus), *Betaflexiviridae* (género Carlavirus) y *Alphaflexiviridae* (género Allexivirus). El empleo de técnicas biotecnológicas se ha convertido en una herramienta para reducir las infecciones virales, pero estas necesitan proceder de materiales libres de virus. En el presente trabajo, la aplicación de electroterapia (15 V por 5 min) permitió la obtención de plantas *in vitro* de ajo libres de potyvirus en cv. ‘Blanco Criollo’ con una eficiencia del 62,5 %. Este resultado constituye una alternativa para la obtención de propágulos con calidad genética y fitosanitaria para establecer plantaciones más productivas en campo.

Palabras clave: *Allium sativum*, electroterapia, propagación *in vitro*, saneamiento a potyvirus

POTYVIRUS-FREE OBTENCION IN VITRO (*ALLIUM SATIVUM* L.) PRODUCED PLANT

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a common herb consumed worldwide as functional food and traditional remedy for the prevention of infectious diseases since ancient time. Similar to other vegetatively propagated crops, most commercial garlic clones infected by multiple viruses belonging to several genera that are known as the “garlic virus complex”, thus suffering 25 to 50% yield losses and reduced quality. Major infection are caused by the members of three virus families: *Potyviridae* (genus Potyvirus), *Betaflexiviridae* (genus Carlavirus), and *Alphaflexiviridae* (genus Allexivirus). In an attempt to reduce infection load, garlic propagation by biotechnological methods are becoming popular by it need a healthy tissues as starting material. This research, mediated electrotherapy (15 V por 5 min), allows to obtains garlic *in vitro* plants cv. ‘Blanco Criollo’ potyviruses free with 62.5 % efficiency. This result main an alternative that allow obtaining of genetic and phytosanitary quality propagules in order to establish more productive field plantations.

Keywords: *Allium sativum*, electrotherapy, *in vitro* propagation, potyvirus sanitation

INTRODUCCIÓN

El ajo es una planta herbácea oriunda de Asia Centro-oriental, formada por un bulbo subterráneo que a su vez está compuesto por dientes unidos en su base alrededor del tallo verdadero y recubiertos por catáfilos blancos o morados, cuya tonalidad varía, según la variedad y la altura del sitio de siembra (Kamenetsky, 2022). Según FAOStat, (2022), China es el mayor productor de ajo, seguido de India y la República de Corea. En Latinoamérica, Argentina presenta la mayor área de siembra, con 15 600 ha y un rendimiento de 9 t ha⁻¹, seguido por Brasil con 10 214 ha y un rendimiento de 9 t ha⁻¹. No obstante, México y Estados Unidos alcanzan los mayores rendimientos (16,5 t ha⁻¹) y aportan el 2,5 % de la producción mundial, con solo el 1,6 % de la superficie cosechada (Desta *et al.*, 2021).

El ajo se afecta por complejos de virus que contaminan la semilla y reducen su rendimiento. Shemesh-Mayer *et al.* (2022) afirman que prácticamente toda la semilla de este cultivo se infesta por un complejo viral en mayor o menor grado. Los síntomas de la enfermedad son visibles en forma de mosaico o estrías amarillas en las hojas, que causan disminución en la productividad de los bulbos, lo que depende de la variedad y la cantidad de virus presentes en la semilla (Da Silva *et al.*, 2019). Los virus en general son difíciles de eliminar y para ello se usan varias vías, las cuales pueden resultar más o menos efectivas, entre ellas el cultivo de meristemos, la termoterapia, la electroterapia, entre otras (Vivek y Modgil, 2018; Wang *et al.*, 2018). También Hernández *et al.* (1997a) lograron un 60-75 % de las plantas de ajo *in vitro* libres de potyvirus (*Allium sativum* L.) con corriente continua mediante el uso de un dispositivo de electroterapia artesanal (Hernández *et al.*, 1997b). Por tal razón, con vistas a reducir la incidencia de virus en el ajo en Cuba y elevar los rendimientos es necesario establecer un método de regeneración de plantas que facilite la propagación de plantas con calidad genética, que puedan ser empleadas como semilla o propágulos.

Teniendo en cuenta la necesidad de introducir material de plantación de ajo de alta calidad genética y fitosanitaria en la producción, se realizó el presente trabajo, con el objetivo de determinar el efecto de la electroterapia en el saneamiento a potyvirus en el cultivo *in vitro* de ajo cv. 'Blanco Criollo'. Este resultado constituye una alternativa de gran valor, pues brinda una metodología para lograr el material de partida sano para la producción de semilla biotecnológica. Lo anterior permitiría la obtención de propágulos con calidad genética y fitosanitaria para escalar los resultados y establecer plantaciones más productivas en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), donde se utilizó como material vegetal meristemos de ajo del cultivar 'Blanco Criollo'. Para el desarrollo de los experimentos se empleó como medio de cultivo basal las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS). El pH de los medios de cultivos se ajustó a 5.7 con NaOH 0.5 mol L⁻¹ y HCl 0.5 mol L⁻¹ antes de la esterilización en autoclave. Los medios de cultivos y sistemas de cultivos que se emplearon en los experimentos se esterilizaron por vapor en autoclave vertical (BK-75) a 121 °C y 1.20 kg cm⁻². Todos los experimentos tuvieron tres repeticiones por tratamiento y se desarrollaron basados en diseños experimentales completamente aleatorizados.

Diagnóstico a potyvirus en plantas de ajo

Para la detección de los potyvirus se empleó un sistema de diagnóstico ELISA (Clark y Adams, 1977), con la variante ACP-ELISA (del inglés: Antigen-Coated-Plate ELISA), que utiliza un anticuerpo monoclonal específico a potyvirus (DSMZ, Alemania) (Wulandari y Ermayanti, 2011), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de corte de ELISA fue el doble de los valores promedio de absorbancia del control negativo, lo que permitió identificar plantas de ajo sanas y enfermas. Como material de partida se utilizaron plantas de ajo cv. 'Blanco Criollo', infectadas con potyvirus, cultivadas durante treinta días en un invernadero. Después de los tratamientos, las plantas obtenidas *in vitro* fueron diagnosticados entre los siete y 14 días. Los porcentajes de saneamiento y eficiencia se determinaron de acuerdo con Hernández *et al.* (1997a), utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Saneamiento (\%)} = \frac{\text{Número de plantas sanas}}{\text{Número de plantas regeneradas}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia (\%)} = \text{Regeneración de plantas (\%)} \times \text{Saneamiento (\%)}$$

La eficiencia se analizó estadísticamente con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se utilizó el paquete estadístico R 3.3.0 orientado a objetos (*R Development Core Team*, 2016) para comparar la longitud de los segmentos nodales.

Sensibilidad del tejido a la corriente eléctrica

Con el objetivo de trabajar en el saneamiento a potyvirus, mediante electroterapia, se trabajó en determinar la sensibilidad del tejido vegetal a la corriente eléctrica. Se tomaron dientes de aproximadamente 1 cm de longitud proveniente de plantas de ajo positivas para ELISA y se mantuvieron en solución con ácido cítrico al 1 %. Se aplicaron los tratamientos de: 0 (control), 5, 10, 20, 30 y 50 V de corriente continua (CC) durante 5 minutos a 24 dientes (144 en total). Posteriormente todos los dientes se establecieron *in vitro* de acuerdo con la metodología descrita por Cabrera *et al.* (2004). El dispositivo de tratamiento que contiene cuatro circuitos paralelos con seis explantes cada uno se conectó a una fuente de alimentación de CC ajustable (Hernández *et al.*, 1997b). En cada caso se determinó el porcentaje (%) de regeneración.

Saneamiento por electroterapia

Se aplicaron voltajes desde 0 V (control) hasta el límite de sensibilidad determinado previamente a 24 dientes de ajo infectados con potyvirus durante 5 minutos antes del proceso de desinfección (inmersión en hipoclorito de sodio al 3,0 % (NaOCl) durante 20 minutos), según lo descrito por Cabrera *et al.* (2004). Cada tratamiento se repitió cuatro veces. Después de cuatro semanas de cultivo de tejidos se determinó el número de plántulas sanas y regeneradas. Además, se calculó el porcentaje (%) de saneamiento y la eficiencia.

Saneamiento por microondas

Se utilizaron dientes de aproximadamente 1,0 cm de largo de plantas de ajo diagnosticadas como positivas mediante ELISA y se mantuvieron en solución de ácido cítrico a 10 g L⁻¹. El equipo comercial microondas modelo Kenwoo (Corea) se utilizó a 0,5, 0,75 y 1,0 de la potencia nominal, a diferentes tiempos de exposición: 5, 10 y 15 min (Tabla 1). El número de plántulas sanas y regeneradas se determinó después de cuatro semanas de cultivo de tejidos. En este momento se calcularon el porcentaje (%) de saneamiento y la eficiencia.

Tabla 1. Tratamientos de calor por microondas para el saneamiento a potyvirus en ajo.

Valores de potencia nominal (según fabricante)	Tiempo de exposición (min)
0,5	5
0,75	10
1,0	15
0,5	5
0,75	10
1,0	15
0,5	5
0,75	10
1,0	15

Comparación de los métodos de saneamiento por microondas y electroterapia

Se tomaron dientes de aproximadamente 1,5 cm de largo de 10 plantas de ajo positivas a potyvirus para ELISA y se mantuvieron en solución con ácido cítrico al 1 %. Se seleccionaron y repitieron los tratamientos con la mayor eficacia de cada método. Para la comparación entre ambos métodos, al igual que en los casos anteriores, se calculó el porcentaje (%) saneamiento y la eficiencia; además se midió la longitud (cm) de las plántulas de ajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagnóstico a potyvirus en plantas de ajo

La técnica de ELISA resultó efectiva en la diferenciación de aquellas plantas de ajo sanas y las enfermas por la presencia de potyvirus, lo cual permitió realizar los estudios correspondientes con el objetivo de sanear el tejido vegetal con los dos métodos previstos. Con la misma técnica, en combinación con la técnica de RT-PCR, Kereša *et al.* (2021) lograron la identificación de plantas de ajo enfermas de tres virus que afectan al cultivo, tanto en plantas madre como en las regeneradas mediante cultivo *in vitro*.

Desde que se iniciaron los experimentos en el cultivo del ajo se sabe que los virus reducen el peso de los bulbos (y por tanto de su rendimiento) hasta en un 60 % (Lot *et al.*, 1998), por lo que su eliminación en los propágulos a plantar es muy importante para la producción de esta especie. En ese sentido, Conci *et al.* (2003) hallaron que las plantas libres de virus, una vez en el campo, mostraron tendencia a la reducción progresiva de los rendimientos, debido a su exposición al virus y su reinfección. Sin embargo, afirmaron estos autores que, con una renovación con los propágulos sanos, al menos cada cinco años, la producción será mayor que en aquellas plantaciones enfermas.

Sensibilidad del tejido a la corriente eléctrica

La sensibilidad del tejido a la corriente eléctrica se muestra en la tabla 2. A medida que aumenta el voltaje aplicado, la regeneración de las plantas de ajo obtenidas *in vitro* disminuye debido al calor generado dentro de los tejidos lo que provoca efectos irreversibles a la célula vegetal.

Los tratamientos entre 5-10 V no afectaron críticamente el tejido vegetal y se obtuvo una gran cantidad de plántulas regeneradas. A los 20 V la regeneración de las plantas *in vitro* disminuyó casi la mitad, mientras que a los 30 y 50 V la regeneración se afectó drásticamente. Estos resultados demostraron que los valores de corriente continua por debajo de 20 V podrían ser eficientes para el tratamiento de explantes de ajo.

Tabla 2. Sensibilidad de los explantes de ajo a la corriente eléctrica.

Voltaje (V)	Regeneración (%)
5	88/96=91,6
10	81/96=84,4
20	54/96=56,3
30	15/96=15,7
50	0/96=0
Control	92/96=96

La corriente eléctrica puede afectar las mediciones biométricas de las plántulas de papa, como el número de hojas y la longitud del tallo. Al aumentar los voltajes aplicados la potencia eléctrica aumenta por lo que el calor que se libera dentro de la célula vegetal también lo hace, aunque se supone que aumenta la capacidad de la técnica empleada de eliminar las partículas virales también crece la probabilidad de causar daños irreversibles en el tejido. Durante la obtención de plantas libres de virus por electroterapia, la eficiencia de la regeneración de la planta es igualmente importante para la desinfección del virus en cuestión (Lozoya *et al.*, 1996).

Saneamiento por electroterapia

De acuerdo con los resultados sobre la sensibilidad del tejido a la corriente directa para los experimentos de saneamiento de los dientes de ajo mediante electroterapia, en todos los casos, los porcentajes de regeneración se vieron afectados (Tabla 3). La aplicación de 15 V durante 5 min logró los mejores resultados en términos de eficiencia (62,5 %), con diferencias significativas con los otros tratamientos. En el tratamiento control (sin aplicar corriente), hubo una buena regeneración, pero no se obtuvieron plantas *in vitro* sanas.

Tabla 3. Saneamiento de los explantes de ajo cv. “Blanco Criollo” a potyvirus mediante electroterapia.

Voltaje (V)	Regeneración (%)	Saneamiento (%)	Eficiencia (%)
5	86/96=89.6	24/86=27.9	24/96=25 c
10	84/96=87.5	29/84=34.5	29/96=30,2 c
15	72/96=75.0	60/72=83.3	60/96=62,5 a
20	42/96=43.8	38/42=90.5	38/96=39,6 b
Control	96/96=100	0/96=0	0/96=0 d

* Letras diferentes en la misma columna difieren para $p \leq 0,05$.

Estos resultados confirmaron que el equipo y procedimiento de electroterapia patentado en Cuba por Hernández *et al.* (1997b) es muy eficiente. Por lo tanto, podría implementarse como una alternativa para el saneamiento a potyvirus en dientes de ajo

dentro de un esquema certificado de producción de propágulos del cultivo mediante la biotecnología.

La eficiencia de la electroterapia es una curva de consenso entre los valores crecientes de saneamiento y la disminución de la regeneración de las plantas *in vitro*. En este sentido, Emami *et al.* (2011) obtuvieron regeneraciones del 54,0-70,8 % en seis cultivares de papa sometidos a electroterapia, con diferencias significativas entre ellos, pero solo lograron la eliminación completa del virus de la papa A y el potyvirus Y de la papa en uno de los cultivares evaluados (cv. "Lady Roseta").

La electroterapia se ha aplicado con éxito en varios programas de producción de semillas, como la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) para el saneamiento de virus, Hernández *et al.* (1997c) que lograron un 73-100 % de plantas sanas cuando se aplicaron tratamientos de 5-20 V durante 5 min. Por su parte, Bernal (1997) aplicó electroterapia para el saneamiento del virus del rollo de hoja de papa (PLRV) y concluyó que la corriente eléctrica a 5 V durante 5 min en los ápices meristemáticos resultó eficiente.

Saneamiento por microondas

La tabla 4 muestra los resultados del saneamiento del potyvirus obtenidos con tratamientos de electroterapia disuelto en agua. La inmersión de los dientes de ajo no tiene un efecto drástico sobre la regeneración, independientemente de la concentración de electroterapia y el tiempo de exposición utilizado.

Tabla 4. Saneamiento de los explantes de ajo cv. 'Blanco Criollo' a potyvirus mediante microondas.

Potencia nominal	Tiempo de exposición (min)	Regeneración (%)	Saneamiento (%)	Eficiencia (%)
0,5	5	86/96=89,5	31/86=36,0	31/96=32,3 c
0,5	10	87/96=90,6	29/87=33,3	29/96=30,2 c
0,5	20	84/96=87,5	34/84=40,5	34/96=35,4 bc
0,75	5	84/96=87,5	42/85=49,4	42/96=43,8 b
0,75	10	80/96=83,3	59/80=73,8	59/96=61,5 a
0,75	20	81/96=84,3	58/81=71,6	58/96=60,4 a
1,0	5	80/96=83,3	55/80=68,7	55/96=57,3 a
1,0	10	84/96=87,5	58/84=69,0	58/96=60,4 a
1,0	20	78/96=81,3	57/78=73,1	57/96=59,4 a
Control		90/96=93,8	0/90=0	0/96=0

* Letras diferentes en la misma columna difieren para $P \leq 0,05$

Los mejores resultados se obtuvieron a 0,75-1,0 V durante 10-20 min con eficiencias superiores al 57,3 %. Según los resultados, el efecto del calor microondas alcanzó una meseta relacionada con el establecimiento *in vitro* y el saneamiento del virus. La aplicación de este en el saneamiento de virus en plantas es muy limitada.

Comparación de los métodos de saneamiento por microondas y electroterapia

Tanto la electroterapia como los tratamientos con calor mediante microondas lograron tasas similares de eficiencia, estadísticamente superiores al control (Tabla 5).

La aplicación de corriente eléctrica alcanza altos porcentajes de saneamiento. Por ejemplo, Igarza *et al.*, (2001) utilizaron la electroterapia para la eliminación del virus del mosaico de la malanga (DMV- *Dasheen Mosaic Virus*, del inglés) y lograron un saneamiento de hasta el 100 % en *Xanthosoma sagittifolium* Schott y otras aráceas.

Tabla 5. Comparación de los resultados obtenidos por electroterapia y tratamientos con calor por microondas.

Tratamientos	Regeneración (%)	Longitud (cm)	Saneamiento (%)	Eficiencia (%)
0,75 Potencia Nominal durante 20 min	71/96=74,0	2,96 b	61/71=85,9	61/96=63,5 a
15 V durante 5 min	84/96=87,6	4,84 a	60/84=71,4	60/96=62,5 a
Control	93/96=96,9	1,66 c	0/93=0	0/96=0 b

* Letras diferentes en la misma columna difieren para prueba de Tukey para $p \leq 0,05$

La aplicación de electroterapia no genera residuales peligrosos o contaminantes por lo que podría convertirse en una etapa esencial durante la propagación *in vitro* del ajo. En un estudio reciente de Kaur *et al.* (2019) se utilizaron los métodos de termoterapia (37 °C), quimioterapia (30 mg L⁻¹ de ribavirin durante 30 días) y electroterapia (30 mA por 20 min) solos o en combinación, con vistas a eliminar el virus BYMV (*Bean yellow mosaic virus*, del inglés) en gladiolos. Estos autores observaron que la mejor respuesta se obtuvo en la combinación de la electroterapia con la quimioterapia. También, Kudělková *et al.* (2015) eliminaron satisfactoriamente el virus GCLV en cinco genotipos de ajo combinando el cultivo de meristemos y la quimioterapia con ribavirin. Dentro del cultivo *in vitro*, la embriogénesis somática ha sido efectiva en la eliminación de virus en yuca (Damba *et al.*, 2013) y caña de azúcar (Dewanti *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

1. La aplicación de corriente continua 5-10 V por 5 min permite la obtención de plantas *in vitro* de ajo libre de potyvirus en cv. "Blanco Criollo; eficiencia de 62.5 %.
2. La aplicación de la electroterapia permite lograr la desinfección del tejido y el saneamiento del potyvirus durante el Programa de producción de semillas biotecnológicas en Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-LATTIF, H.M.; R. ABSY, M.M.M. ATTA. 2018. Effect of growth promoter supplement on yield and grain quality of maize (*Zea mays* L). *Egyptian Journal of Agronomy*, 40(2):165-80.
- AHMED MEM, DERBALA A, EL-KADER NA. 2009. Effect of Irrigation Frequency and Potassium Source on the Productivity, Quality and Storability of Garlic. *Misr Journal of Agricultural Engineering*, 26(3):1245-62.
- CABRERA, M. and J.E. GONZÁLEZ. 2014. Ozone as an alternative for disinfection of

- explants during *in vitro* mass plant propagation. *Ozone: Science & Engineering.*, 36:435–39. doi: 10.1080/01919512.2013.874940.
- CABRERA M, KOSKY R, ESPINOSA E, ESPINOSA A. 2012. Effect of semi-automated culture systems on yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation. *Biotechnology Agronomy and Social Environmental*, 16(2):45-53.
- CALVO E, BARBÓN R, JIMÉNEZ E, DE FERIA M, CHÁVEZ MAITE, CAPOTE A, PÉREZ N. 2007. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 42:298-00.
- CATALYSIS. 2020. VIUSID agro, promotor del crecimiento. Consultado 20 de marzo 2020. Disponible en: <http://www.catalysisagrovete.com>.
- CLARK MF, ADAMS AN. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immune sorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34:475-483.
- DA SILVA LA, OLIVEIRA AS, MELO FL, ARDISSON-ARAUJO DM, RESENDE FV, RESENDE RO, RIBEIRO BM. 2019. A new virus found in garlic virus complex is a member of possible novel genus of the family Betaflexiviridae (order Tymovirales). *Peer Journal* 7, e6285.
- DESTA B, WOLDETSADIK K, ALI WM. 2021. Effect of Harvesting Time, Curing and Storage Methods on Storability of Garlic Bulbs. *Open Biotechnology Journal*, 15, 36-45.
- EMAMI D, MOZAFARI J, BABAEIYAN N, RAHIMIAN H. 2011. Application of electrotherapy for the elimination of potato potyviruses. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13:921-27.
- ESCALONA, M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Phytophthora annual*, 48-50.
- FAOStat. 2022. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2022. Disponible en: <https://www.fao.org>. Consultado: 30 de junio de 2022.
- GALVEZ D; CABRERA M; BEOVIDES Y; ROBAINA A; RODRÍGUEZ S; RODRÍGUEZ D. 2013. Establecimiento *in vitro* de yemas axilares del cultivar de *Colocasia esculenta* Schott 'INIVIT MC-2001'. *Biotecnología Vegetal*, 13(2):107-12.
- GALVEZ D; RODRÍGUEZ SJ; DOMÍNGUEZ K; BEOVIDES Y; GÓMEZ R; POSADA L; PEÑA K; ROBAINA A. 2021. Impact of the use of VIUSID Agro® on the production and postharvest conservation of garlic (*Allium sativum* L.) *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 14(5): 9-12 DOI: 10.9790/2380-1405020912
- GALVEZ D; RODRÍGUEZ SJ; DOMÍNGUEZ K; JIMÉNEZ A; GÓMEZ R; POSADA L; PEÑA K; KUKURTCU B. 2021. Somatic embryogenesis and regeneration of plants in 'Blanco Criollo' garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 7(3): 14-23. DOI: 10.9790/264X-0703011423.
- GALVEZ D, RODRÍGUEZ SJ, DOMÍNGUEZ K, ROBAINA A, RUBIO A. 2019. VIUSID Agro® en la propagación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.). *Agricultura Tropical*, 5(1):34-44.
- HERNÁNDEZ R; FONTANELLA J; NOA JC; PICHARDO T; MANZO R; H. CÁRDENAS. 1997a. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. Registro de patente de la República de Cuba A01/08 No 22496.
- HERNÁNDEZ R; IGARZA J; GONZÁLEZ Y; PERALTA EL; FONTANELLA R; NOA J; PICHARDO T; ALONSO A; GARCÍA L; M RODRÍGUEZ. 1997b. Nuevo método para el saneamiento a virus y bacteria en caña de azúcar (*Saccharum* spp.

- híbrido). *Cuadernos de Fitopatología*, 3:153-7.
- HERNÁNDEZ R; NOA JC; PICHARDO T; Y IGARZA. 1997c. Electroterapia, nuevo método para el saneamiento a virus en *Allium sativum* L. con optimización del diagnóstico por UM – ELISA. *Centro Agrícola*, 24:92-93.
- IGARZA CJ; HERNÁNDEZ; PR; CASTELLANOS BC. 2001. La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en malanga. *Manejo Integrado de Plagas*; 60:57-60.
- JACKSON MB. 2005. Aeration stress in plant tissue cultures. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 459-473. ISBN 978-1-4020-3199-1.
- KAMENETSKY, R. 2007. Garlic: Botany and horticulture. In *Horticultural Reviews*; Corelli-Grpadelli, L., Kamenetsky, R., Prange, R., Eds.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, Volume 33, pp. 123–172. ISSN 0163-7851.
- KELEŞ D; TASKIN H; BAKTEMUR G; YÜCEL NK; BÜYÜKALACA S. 2011. Somatic Embryogenesis in garlic (*Allium sativum* L.). *Acta Horticulturae*, 923:39-45. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.923.4.
- KEREŠA S; KURTOVIĆ K; BAN SG; VONČINA D; JERČIĆ IH; BOLARIC S; LAZAREVIĆ B; GODENA S; BAN D; MIHOVILOVIĆ AB. 2021. Production of virus-free garlic plants through somatic embryogenesis. *Agronomy*, 11:87-96. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050876>.
- LIMERA C; SABBADINI S; SWEET JB; MEZZETTI B. 2017. New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species. *Front Plant Sci.*, 15(8): 14-18. doi: 10.3389/fpls.2017.01418.
- LOZOYA H; ABELLO F; G GARCÍA. 1996. Electrotherapy and shoot tip culture eliminate PVX in potatoes. *American Potato Journal*, 73:149-54.
- MINAG. 2018. Estadísticas, Ministerio de la Agricultura, Cuba.
- MURASHIGE T, SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-97.
- PARADIKOVIĆ N; ZELJKOVIĆ S; TKALEC M; VINKOVIĆ T; MAKSIMOVIĆ I; HARAMIJA J. 2017. Influence of biostimulant application on growth, nutrient status and proline concentration of begonia transplants. *Biological Agriculture & Horticulture*, 33(2): 89-96.
- PEÑA K; RODRÍGUEZ JC; MELÉNDREZ JF. 2015. Efecto de un promotor del crecimiento activado molecularmente sobre la germinación y la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Infociencia*, 19(3):1-12
- SHEMESH-MAYER E; GELBART D; BELAUSOV E; SHER N; DAUS A; RABINOWITCH HD; KAMENETSKY-GOLDSTEIN R. 2022. Garlic potyviruses are translocated to the true seeds through the vegetative and reproductive systems of the mother plant. *Viruses*, 14, 2092. <https://doi.org/10.3390/v14102092>.
- SIMPSON G. 2006. Plant systematics. En: *Diversity and classification of flowering plants*. pp. 137-226. Elsevier Academic press.
- VILCHEZ J; ALBANY N; MARTÍNEZ L; MOLINA M; ÁLVAREZ C; LEAL E; BERMÚDEZ L. 2011. Establecimiento *in vitro* de ocumo blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Rev. Fac. Agron.*, 28(1):434-44.
- WULANDARI DR, ERMAYANTI TM. 2011. Detection of potyvirus using RT-PCR and ACP-ELISA of Dioscorea species and in vitro shoot multiplication of the virus free plants. *Annales Bogorienses* 15:1-8.